

Aus der
Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Bernd Kremer)
Sektion Molekulare Onkologie
(Leiter: Prof. Dr. Holger Kalthoff)
der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die Rolle des Epimorphin in der Epithelzelldifferenzierung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Diplom Biologin Heike Papavlassopoulos
aus Heide

Kiel
2006

Referent/in:

Koreferent/in

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Duktales Adenokarzinom des Pankreas	
(„pancreatic ductal adenocarcinoma“, PDAC)	1
1.1.1. Ursachen der Entstehung des PDAC	1
1.1.2. Tumorigenese des PDAC	2
1.1.3. Malignität des PDAC	5
1.2. Proliferation	7
1.3. Zelltod	7
1.4. Epithelgewebe	8
1.4.1. Polarisierung	9
1.4.1.1. CEACAM1	10
1.4.1.2. Zytoskelett	11
1.4.1.3. Proteinsortierung und Vesikelverkehr	11
1.4.1.4. Sphingolipide	13
1.5. Das A818-6 „hollow sphere“ System als	
<i>in-vitro</i> Differenzierungsmodell	14
1.6. Epimorphin	15
1.7. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Epimorphin-Sequenzen	23
2.2. Plasmide	24
2.3. Konstrukte	25
2.4. Primersequenzen	26
2.5. Antikörper	27
2.6. Inhibitoren für die Zellkultur	29
2.7. Generierung der Epimorphin-codierenden DNA mittels PCR	29
2.8. Auftrennung der Nukleinsäure mittels Agarosegel-Elektrophorese	30
2.9. Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel	31
2.10. Phenol-Chloroform-Extraktion	32
2.11. Alkohol-Fällung der DNA	32
2.12. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.13. Ligation der DNA-Fragmente in den retroviralen Vektor pLXIN	33
2.14. Transformation der DNA in <i>Escherichia coli</i>	34
2.15. Screening nach positiven Klonen	35

2.16. PCR zum Nachweis positiver Klone und der richtigen Orientierung des Inserts im Vektor	36
2.17. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
2.18. Sequenzierung von DNA	38
2.19. Isolierung genomischer DNA aus A818-6 und A818-4	38
2.20. RNA-Isolierung aus A818-6 und A818-4	39
2.21. Reverse Transkription PCR (RT-PCR)	39
2.22. Semiquantitative RT-PCR zur Detektion des pp60c-src-Transkripts	41
2.23. Standardkultivierung eukaryotischer Zelllinien	42
2.24. Detektion der Mycoplasmen-Infektion mittels „nested PCR“	43
2.25. 3D Kultivierung	44
2.26. Kokultivierung	45
2.27. Inhibitorbehandlung der Zellen	46
2.28. Lipofektion von 293T Zellen zur Herstellung retroviraler Überstände	46
2.29. Transduktion adhärenter Zellen	48
2.30. Herstellung konditionierter Medien	48
2.31. Herstellung von Proteinlysaten	49
2.32. Immunpräzipitation von pp60c-src	50
2.33. Ko-Immunpräzipitation von pp60c-src	51
2.34. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
2.35. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.36. Westernblot	53
2.37. TRAP-Assay	55
2.38. Immunzytochemie	57
2.39. Färbungen für die Durchflusszytometrie	58
2.40. Herstellung der Zellüberstände zum Nachweis des extrazellulären Epimorphin	60
2.40.1. Detektion von Epimorphin im Zellüberstand	60
2.41. Viabilitätsassay	60
2.42. 3H-Thymidin-Inkorporationsmethode	61
2.43. Lipidextraktion	62
2.44. Dünnschichtchromatografie zur Bestimmung des C_{16/18}-Ceramid-Gehalts	63
2.45. Differenzierungs-Microarray	64

3. Ergebnisse	65
3.1. Die Rolle von Epimorphin in der Entwicklung von A818-6 „hollow spheres“	65
3.1.1. <i>Hypothese</i>	65
3.1.2. <i>Lokalisation des Epimorphin in A818-6 und A818-4-Zellen</i>	66
3.1.3. <i>Herstellung Epimorphin-überexprimierender A818-4 und A818-6-Zellen mittels retroviraler Transduktion</i>	67
3.1.3.1. Detektion von Epimorphin im Gesamtzell-Lysat	67
3.1.3.2. Detektion des Epimorphin im Mediumüberstand der transduzierten Zellen	68
3.1.3.3. Detektion des Epimorphin im Gesamtzell-Lysat nach simultaner Transduktion verschiedener Epimorphin-Isoform-Kombinationen in A818-4-Zellen	69
3.1.4. <i>Morphologische Untersuchungen an Epimorphin-überexprimierenden Zellen</i>	69
3.1.4.1. Morphologie der Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen	69
3.1.4.2. Morphologie der Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen	72
3.1.4.3. Kokultivierung der Epimorphin-transduzierten A818-4-Zellen	74
3.1.4.4. Kokultivierung der Epimorphin-transduzierten A818-6-Zellen	80
3.1.5. <i>Untersuchungen zur Zellproliferation in Abhängigkeit von Epimorphin</i>	80
3.1.5.1. Expression Zellzyklus-abhängiger Proteine in Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen	80
3.1.5.2. Nachweis der Erk- und p38-Aktivierung	81
3.1.5.3. Proliferation	82
3.1.5.4. Zellzyklus-Analysen	84
3.1.6. <i>Telomeraseaktivität in Abhängigkeit von Epimorphin</i>	85
3.1.7. <i>Apoptose in Abhängigkeit von Epimorphin</i>	86
3.1.7.1. Apoptosesensitivität gegenüber CH11 (Anti-CD95)	86
3.1.7.2. Expression Apoptose-relevanter Proteine	87
3.1.8. <i>Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in Abhängigkeit von Epimorphin in A818-4 und A818-6-Zellen mittels Microarray-Analysen</i>	90
3.1.8.1. Ceramid-Generation in Abhängigkeit von Epimorphin	90
3.1.9. <i>Die Rolle von Sphingolipiden bei der A818-6-“hollow sphere“-Entwicklung</i>	92
3.1.9.1. Inhibierung der Ceramid-Generierung	93
3.1.9.2. Inhibierung der Sauren Ceramidasen	94
3.1.10. <i>Expression des Proteins pp60c-src in Epimorphin-überexprimierenden A818-4 und A818-6 „monolayer“-Zellen</i>	95
3.1.10.1. Kolokalisation von aktivem pp60c-src und Epimorphin	96
3.1.10.2. Kopräzipitation der Epimorphin-Isoform I und II mit pp60c-src	97
3.1.10.3. Phosphorylierung von pp60c-src	97
3.1.11. <i>Die Rolle des aktiven pp60c-src in der A818-6-“hollow sphere“-Bildung</i>	98
3.1.11.1. Zellzyklus-Analysen von Herbimycin A-behandelten A818-6-Zellen in 3D-Kultur	99
3.2. A818-6-“hollow sphere“-Entwicklung	100
3.2.1. <i>„hollow sphere“-Entwicklung in Abhängigkeit von der Zelldichte</i>	100
3.2.1.1. Die Rolle von CEACAM1 bei der „hollow sphere“-Entwicklung	103
3.2.2. <i>Caspase-abhängige Apoptose während der A818-6-“hollow sphere“-Entwicklung</i>	104
3.2.2.1. M30-Färbung unreifer A818-6 „hollow spheres“	104
3.2.2.2. PARP-Spaltung während der „hollow sphere“-Entwicklung	106
3.2.2.3. „Hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk	107

3.2.2.4.	Caspase-abhängige Apoptose während der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit des sauren Sphingomyelinase-Inhibitors Desipramin und des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk	108
3.2.2.5.	Inhibierung von Caspase-unabhängigen Apoptose-Prozessen während der A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung	109
3.2.3.	„Hollow sphere“ Entwicklung in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren	110
3.2.3.1.	Inhibierung der MAP-Kinasen MEK und p38	110
3.2.3.2.	Inhibierung von PKCs	112
4.	Diskussion.....	119
4.1.	3-D- Kultur	119
4.2.	Epimorphin	119
4.2.1.	<i>Klonierung der Epimorphin-Isoformen</i>	119
4.2.2.	<i>Retrovirale Transduktion der Epimorphin-codierenden DNA in A818-6 und A818-4-Zellen</i>	120
4.2.3.	<i>Detektion von Epimorphin</i>	121
4.2.4.	<i>Morphologie der Epimorphin-überexprimierenden A818-4- und A818-6-Zellen in 3D-Kultur</i>	122
4.2.5.	<i>Kokultur-Experimente</i>	123
4.2.6.	<i>Untersuchungen zur Proliferation und Zellzyklus-Analysen</i>	125
4.2.7.	<i>Telomeraseaktivität</i>	125
4.2.8.	<i>Einfluss von Epimorphin auf pp60c-src</i>	126
4.2.9.	<i>Apoptose</i>	127
4.2.10.	<i>Einfluss von Epimorphin auf Ceramide</i>	128
4.3.	„hollow sphere“-Entwicklung	129
4.3.1.	<i>Apoptose während der „hollow sphere“-Entwicklung</i>	129
4.3.2.	<i>CEACAM1</i>	130
4.3.3.	<i>An der „hollow sphere“-Entwicklung beteiligte Signalwege</i>	131
4.3.3.1.	MAP-Kinase-Signalwege	132
4.3.3.2.	Proteinkinase C (PKC)	133
4.3.3.3.	Sphingomyelin-Metaboliten	134
Zusammenfassung.....		137
Summary		140
Abkürzungsverzeichnis.....		142
Referenzen.....		146
Danksagung.....		161
Curriculum vitae		163
Erklärung		165

1. Einleitung

1.1. Duktales Adenokarzinom des Pankreas

(„pancreatic ductal adenocarcinoma“, PDAC)

Das duktale Adenokarzinom ist mit 80-90 % der häufigste maligne Pankreastumor (Lionetto et al., 1995). Dieser hochmaligne epitheliale Tumor steht in seiner Häufigkeit weltweit an 12. Stelle der Krebserkrankungen. Aufgrund der hohen Letalität nahm das Pankreaskarzinom im Jahr 1996 sogar Platz 5 der krebsbedingten Todesfälle in der Bundesrepublik Deutschland ein (Ahlgren, 1996). Zwei Drittel der Patienten sind älter als 60 Jahre, weshalb man beim Pankreaskarzinom von einer Krankheit des Alters spricht. Männer tragen ein höheres Risiko als Frauen (1,5:1). Die Prognose dieser Erkrankung ist sehr schlecht (Carpelan-Holmstrom et al., 2005). Aufgrund des Fehlens spezifischer Frühsymptome und einer effektiven Diagnostik sind zum Zeitpunkt der Diagnose lediglich 10-15 % der Tumore operabel. Da es bei dieser Krebserkrankung frühzeitig zur Invasion des peripankreatischen Gewebes kommt, sind zum Zeitpunkt der Operation in über 50 % der Fälle bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden. Hinzu kommt eine eingeschränkte Effektivität der Chemotherapie, wodurch letztlich nach der Operation eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur ca. 10 % erreicht wird (Gebhardt et al., 2000).

Hinsichtlich der Ätiologie ist das Zigarettenrauchen der am besten untersuchte Risikofaktor. Im Vergleich zu Nichtrauchern haben Raucher ein über zweifach höheres Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Howe et al., 1991). Viel Fleisch, Fett, Cholesterin und Protein in der Ernährung sowie bestimmte Kochtechniken können die Karzinomentwicklung begünstigen (Anderson und Scheiman, 2002). Äußere Einflüsse, wie z.B. Cadmium (Schwartz und Reis, 2000) oder Pestizide (Ojajarvi et al., 2000). Vorerkrankungen, wie Diabetes mellitus (Michaud, 2004), chronische Pankreatitis (Maisonnette und Lowenfels, 2002); (Whitcomb, 2004); (Barman et al., 2003) und Magenresektion (Anderson et al., 1996); (Michaud, 2004) können ein erhöhtes Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken mit sich bringen. Des Weiteren liegt auch eine genetische Disposition vor (Hahn und Bartsch, 2004); (Ghadirian et al., 1991); (Mangray und King, 1998).

1.1.1. Ursachen der Entstehung des PDAC

Die maligne Transformation ist ein Mehrstufenprozess, bei dem es im zeitlichen Verlauf zu einer sukzessiven Abfolge von genetischen und/oder epigenetischen Aberrationen kommt, die eine Kaskade diverser, sehr heterogener Folgeerscheinungen mit sich bringen. Art und Abfolge solcher Veränderungen sind stark tumorabhängig.

Genetische Alterationen, wie z.B. Punktmutationen, können Proteine in ihrer biochemischen Eigenschaft stark verändern und deren Funktion beeinträchtigen, indem sie sowohl konstitutiv aktiviert oder aber auch inaktiviert sein können. Kommt es nun infolge solcher Mutationen zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, ist der Weg für eine maligne Transformation geebnet.

Epigenetische Aberrationen hingegen erzeugen ein anderes Expressionsprofil, indem die Zugänglichkeit des entsprechenden Promotors für die Transkriptionsfaktoren durch z.B. Modifizierungen der Histone (z.B. Methylierungen, Acetylierung) variiert wird. Auch in Assoziation mit dem Pankreaskarzinom werden solche epigenetischen Veränderungen in einigen Veröffentlichungen beschrieben (Jansen et al., 2002; Sato et al., 2003; Sato et al., 2005a; Sato et al., 2005c).

Des weiteren können ganze Chromosomenarme oder aber auch nur kurze Sequenzen in einem Gen deletiert sein oder hinzukommen. Dadurch können einige Proteine vermindert oder vermehrt synthetisiert werden. Solche chromosomalen Aberrationen tragen sehr häufig zur Entstehung maligner Tumore bei. Untersuchungen an insgesamt 33 PDAC mit Hilfe der CGH-Methode („comparative genome hybridization“) offenbarten bei 67 % der Tumore genomische Veränderungen, die drei (12 %) oder mehr (55 %) chromosomale Regionen betrafen. Sehr wahrscheinlich codieren diese veränderten Regionen auch für Tumor-relevante Proteine, die an der pankreatischen Karzinogenese beteiligt sind (Schleger et al., 2000; Sunamura et al., 2004). Besonders häufig wurde ein Verlust der Chromosomenarme 9q, 17p und 18q beobachtet, (Schleger et al., 2000); (Lumadue et al., 1995), was mit der chromosomalen Lokalisation wichtiger Tumorsuppressorgene, wie p53 (17p) und Smad4 (18q), korreliert.

Auch Centrosomen-Abnormalitäten scheinen schon in der frühen pankreatischen Karzinogenese eine Rolle zu spielen, da in 85 % der Pankreaskarzinome veränderte Centrosomen-Profile nachgewiesen wurden. Defekte Centrosomen werden u. a. für den Verlust der Zellpolarität sowie für eine fehlerhafte Chromosomen-Segregation verantwortlich gemacht (Sato et al., 1999).

1.1.2. Tumorigenese des PDAC

Ein initiales Ereignis der pankreatischen Karzinogenese ist in 90 % der Fälle eine Ki-Ras-Mutation (Rozenblum et al., 1997); (Hruban et al., 1993), die meist im Codon 12 vorzufinden ist (Luttges et al., 1998); (Hruban et al., 1993); (Tada et al., 1991). Ras ist eine GTPase, die Signale von Rezeptor-Tyrosinkinasen in den Nukleus überträgt und so Zellwachstum, Migration, Apoptose und Differenzierung reguliert (Campbell et al., 1998); (Khosravi-Far et al., 1998); (Marshall, 1999); (Bargi, 2001). Die Punktmutation hat eine konstitutive Aktivierung dieses Onkogens zur Folge, indem der aktive, GTP-gebundene Zustand arretiert wird. Folglich führt dies zur Entstehung eines autonomen Signalgenerators, der einerseits das Zellwachstum über Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs

stimuliert (Leevers und Marshall, 1992) und andererseits durch Aktivierung des Phospho-Inositol-3 Kinase-Signalwegs das Überleben der Zelle fördert (Bonni et al., 1999; Downward, 1998).

Während die Ki-Ras-Mutation ein initiales Ereignis der Tumorigenese darstellt und meist bereits schon in den frühen „pancreatic intraepithelial neoplasia“ (PanIN) Vorläuferläsionen vorzufinden ist (Lohr et al., 2005), wird eine maligne Progression durch die additive Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene forciert (Hruban et al., 2000b; Hruban et al., 2000a).

Eines der Tumorsuppressorgene codiert für p16 (CDKN2 oder INK4), das eine Zellzyklus-regulierende Funktion durch die Inhibition der Komplexbildung von Cyclin D-cdk4 („cyclin-dependent kinase 4“) einnimmt. Dadurch wird der Eintritt von der G1 zur S-Phase unterbunden. Die Inaktivierung von p16 durch entweder Mutation oder Deletion des Gens ist bereits in diversen humanen Krebsarten beschrieben worden (Huang et al., 1996); (Liu et al., 1995). Auch bei der pankreatischen Karzinogenese wird die p16-Inaktivierung, koexistierend zur Ki-Ras-Mutation, mit einer zunehmenden Malignität in Verbindung gebracht (Moore et al., 2003).

Im weiteren Transformations-Prozess kommt es häufig noch zu einer zusätzlichen Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53 und „mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)“ (Smad4) (Klein et al., 2002); (Luttges et al., 2001). Das Tumorsuppressorgen p53 ist in humanen Tumoren das wohl am häufigsten mutierte Gen. Ungefähr 75 % aller untersuchten Pankreaskarzinome weisen einen Allelverlust des p53-Lokus auf und über 50 % zeigen eine Mutation im p53-Gen (Lowenfels et al., 1993). Auch hier handelt es sich, wie bei der Ki-Ras-Mutation, meist um eine Punktmutation, die allerdings die Funktion des Proteins blockiert (Rozenblum et al., 1997). Gleichzeitig kommt es neben der Mutation auch zu einer Überexpression des mutierten Gens, weshalb dem mutierten p53 nicht nur eine inaktive tumorsuppressive, sondern auch eine onkogene Eigenschaft zugesprochen wird (Kim und Deppert, 2004); (Deppert, 1996). Wildtyp p53 schützt die Zelle vor genetischen Veränderungen, indem es bei einem DNA-Schaden entweder einen Wachstumsarrest zur DNA-Reparatur oder ggf. den Zelltod einleitet (Heinrichs und Deppert, 2003). Des weiteren fungiert p53 auch als Transkriptionsfaktor. Das mutierte p53-Protein reguliert jedoch die Transkription anderer Zielgene als das Wildtyp-Protein, wodurch auch die onkogene Wirkung erklärt werden kann (Kim und Deppert, 2004). Außerdem kann mutiertes p53-Protein durch Oligomerisierung mit dem Wildtyp Protein dessen tumorsuppressive Funktion unterbinden. Eine wachstumshemmende Wirkung von „antisense“- oder modifizierten Oligonukleotiden gegen p53 in Pankreastumorzellen konnte sowohl *in-vitro* (Fiedler et al., 1998) als auch *in-vivo* (Tepel et al., 2004) in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden.

Der Tumorsuppressor Smad4 ist in ca. 55 % aller Adenokarzinome des Pankreas infolge einer genetischen Mutation bei gleichzeitiger Deletion des zweiten Allels („loss of heterozygosity“, LOH) oder durch homozygote Deletion beider Allele inaktiviert (Hahn et al., 1996). Die Funktion von Smad4 besteht darin, Signale von „transforming growth factor“ (TGF)-beta-Liganden und den entsprechenden transmembranen TGF-beta-Rezeptoren von der Zelloberfläche in den Nukleus weiterzuleiten, wo dann die entsprechenden Zielgene transkriptionell reguliert werden. Abhängig vom

Einleitung

Zellkontext kann TGF-beta sehr viele unterschiedliche Wirkungen auf Zellen ausüben. Wachstumsinhibition durch Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase gehört jedoch zu seinen vorherrschenden Funktionen in den meisten Zelltypen (Blobe et al., 2000); (Massague et al., 2000).

Eine weitere für das Pankreaskarzinom ausschlaggebende genetische Veränderung bewirkt die Inaktivierung des Tumorsuppressors BRCA2 (Lal et al., 2000). BRCA2 spielt in der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle und ist somit für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verantwortlich (Moynahan et al., 2001).

In 80 % aller malignen Tumore kommt es zu einer Aktivierung der Telomerase, einem Ribonukleoprotein, das der stetigen Verkürzung der Chromosomenenden infolge des „End-Replikations-Problems“ entgegenwirkt (Djojotubroto et al., 2003). Nach dem genetischen Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms von Bardeesy (Bardeesy und DePinho, 2002) kommt es erst beim invasiven Adenokarzinom zu einer Aktivierung der Telomerase. Dies konnte im Vergleich zum Normalgewebe bei allen untersuchten PDAC festgestellt werden (Mizumoto et al., 1996).

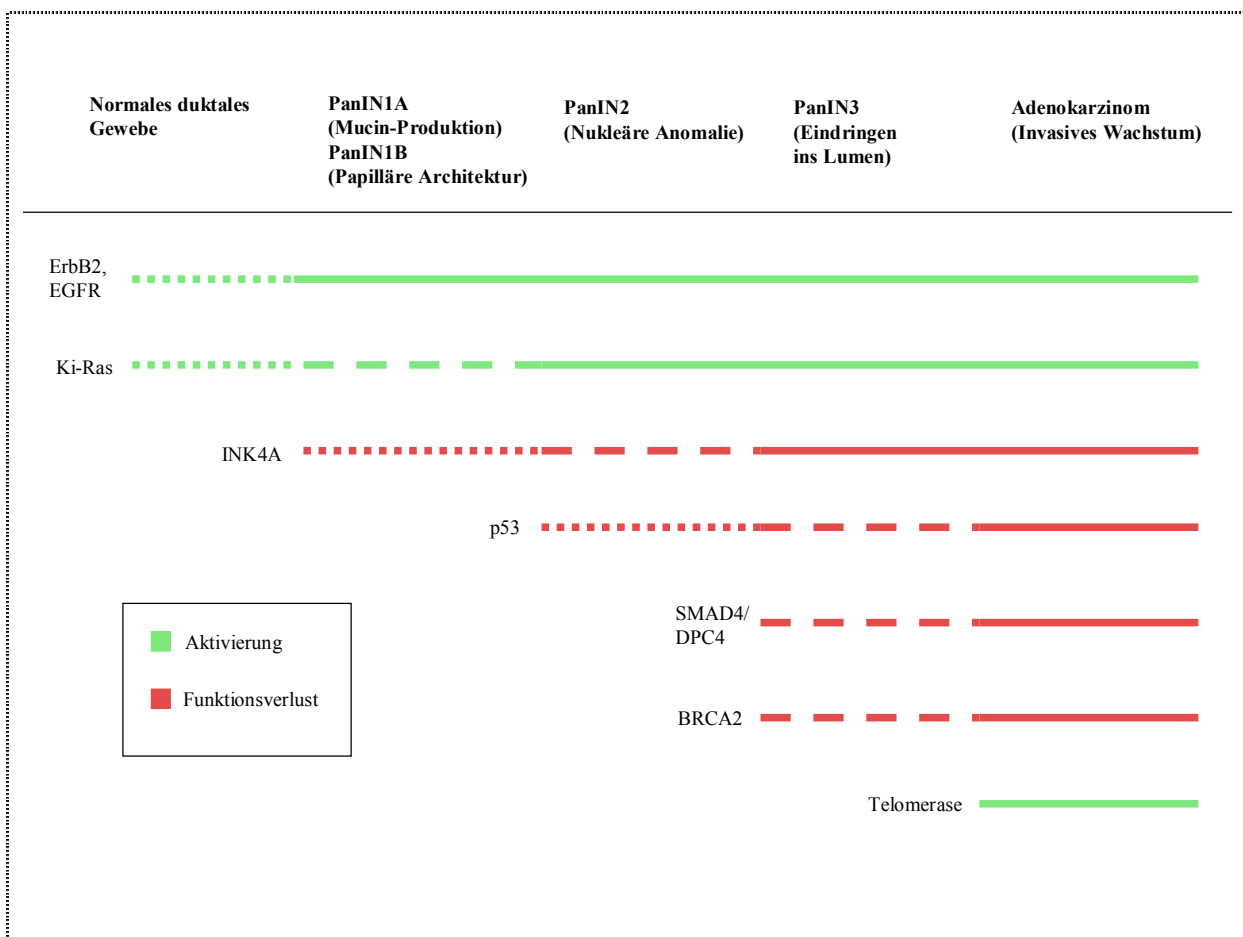


Abbildung 1: Genetisches Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms nach Bardeesy (2002). Die Zunahme der Linienkontinuität symbolisiert eine Zunahme der Häufigkeit des Ereignisses.

Neben diesen bereits beschriebenen Veränderungen im Pankreaskarzinom, kommt es auch zur anomalen Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren (z.B.: „epidermal growth factor“, EGF;

TGFalpha sowie „acidic and basic fibroblast growth factor“, aFGF und bFGF) und der entsprechenden Rezeptoren. Auf diese Weise können die Pankreastumorzellen autokrin sich selbst oder parakrin Fibroblasten stimulieren. Das könnte die beim Pankreaskarzinom häufig beobachtete Bindegewebsproliferation (Desmoplasie) erklären. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass in 8 von 18 Pankreaskarzinom-Zelllinien eine konstitutive mRNA-Synthese des Biglycan (BGN) vorliegt. Die TGF-beta induzierte Expression des Biglycan wird über den Smad- und MKK6-p38 MAP-Kinase-Signalweg vermittelt (Chen et al., 2002; Ungefroren et al., 2003).

1.1.3. Malignität des PDAC

Die Aggressivität eines Tumors wird bestimmt durch dessen Metastasierungspotential, Fähigkeit zur Angiogenese, immunsuppressiven Eigenschaften sowie dessen Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika.

Metastasierung

Die Schwierigkeit bei der Therapie maligner Tumore liegt vornehmlich darin, auch die Metastasen zu erreichen. Ein Problem, das auch für die schlechte Prognose beim Pankreaskarzinom verantwortlich ist. Damit Tumorzellen überhaupt metastasieren können, müssen sie zunächst fähig sein, sich aus dem Gewebeverband zu lösen. Dafür wird z.B. der Verlust bestimmter Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (E-cadherine) verantwortlich gemacht. Auch im Pankreaskarzinom korreliert der Verlust solcher Adhäsionsmoleküle mit dem Metastasierungspotential (Joo et al., 2002). Weitere Schritte zur Metastasierung sind das Verlassen des Ursprungsgewebes, Durchdringen anderer Gewebe, Aushalten mechanischer Einflüsse im Blutstrom, Niederlassen in anderen Geweben und das dortige Überleben. Bisher ist nicht genau geklärt, welche Faktoren diesen Fähigkeiten zugrunde liegen. Sicher ist jedoch, dass die Zellen gewisse proteolytische Enzyme zum Abbau der extrazellulären Matrix benötigen sowie bestimmte Integrine zum Anheften an die Basalmembran. Diverse Proteine wurden im PDAC entdeckt, die offensichtlich eine Rolle für die Metastasierungsfähigkeit des Tumors spielen. Charakteristisch für das PDAC ist sein Potential zur perineuralen Invasion. Untersuchungen zur Expression bestimmter Neurotrophine sowie der entsprechenden Rezeptoren der „tyrosine kinase receptor“ (Trk)-Familie konnten eine Korrelation zwischen der Zunahme der TrkC Expression und der Invasivität feststellen (Sakamoto et al., 2001). Auch der Einsatz des Inhibitors CEP-701 gegen die Trk-Rezeptorfamilie bewirkte *in-vivo* eine Inhibition der Tumordinvasion (Miknyoczki et al., 1999b; Miknyoczki et al., 1999a). Es konnte des weiteren ein Zusammenhang zwischen der Überexpression des Sialyl Lewis x Antigens¹ und der Ausbildung von Lebermetastasen festgestellt werden (Takahashi et al., 2001). Weitere Faktoren, wie Osteonektin², „tissue factor pathway inhibitor 2“³, Maspin³

¹ Zelladhäsions-Moleküle für Endothelzellen

² Glykoprotein für Zellmatrix-Interaktionen

³ Serinproteinase-Inhibitor

scheinen ebenfalls für die Invasivität des PDAC verantwortlich zu sein (Guweidhi et al., 2005); (Sato et al., 2005b); (Lim et al., 2004).

Angiogenese

Metastasenbildung benötigt in der Regel auch die Fähigkeit zur Neovaskularisierung, um den Tumor mit den nötigen Nährstoffen versorgen zu können. Faktoren, die eine angiogenetische Wirkung ausüben, begünstigen demnach auch den Tumor in seiner Fähigkeit zur Metastasenbildung. Beim PDAC konnte eine Korrelation von einer gesteigerten Thymidin-Phosphorylase-Expression, die angiogenetisch wirkt (Takao et al., 1998), oder einer geringeren Expression von „pigment epithelium-derived factor“, einem Inhibitor für Neovaskularisierung, (Uehara et al., 2004) mit einer ungünstigeren Prognose hergestellt werden. Ebenfalls wurde eine gesteigerte Expression des „vascular endothelial growth factor C“ (VEGF-C) in verschiedenen humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien festgestellt (Sipos et al., 2002; Tang et al., 2001).

Immunsuppression

Krebszellen können sich auf unterschiedliche Weise der Immunabwehr entziehen. In unserer Arbeitsgruppe wurden Patienten mit PDAC hinsichtlich der Produktion immunsuppressiver Cytokine, der Zugänglichkeit des Tumors für infiltrierende Lymphozyten sowie des Verlustes der signaltransduzierenden CD3-Zeta-Kette in den infiltrierenden Lymphozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentrationen von Interleukin-10 und TGF beta 1-2 bei Patienten mit PDAC höher lagen als im Kontrollserum. In 28 von 33 operierten Tumoren konnte nachgewiesen werden, dass die Lymphozyten den Tumor gar nicht erst erreichen. Im Falle einer Lymphozyten-Tumor-Interaktion wurden zum Teil eine Inaktivierung der Lymphozyten durch den Verlust der CD3 Zeta-Kette nachgewiesen (von Bernstorff et al., 2001).

Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika

Tumorzellen mit einer hohen Proliferationsrate und/oder eingeschränkter „DNA-Reparaturmaschinerie“ tragen eine höhere Mutationsfähigkeit. Dies macht sie einerseits leichter angreifbar für Bestrahlung oder Medikamente, die auf den DNA-Stoffwechsel wirken. Andererseits können sie sich durch ihre hohe Mutationsfähigkeit leichter dem Selektionsdruck anpassen und eine Resistenz gegenüber dem Wirkstoff entwickeln. Das kann z.B. die Folge einer Mutation in einem Gen sein, das für eine membrangebundene Transport-ATPase aus der Großfamilie der ABC-Transporter codiert. Diese Transporter können bestimmte Arzneistoff-Gruppen wieder aus der Zelle hinausschleusen mit dem Ergebnis, dass die Zelle nicht nur gegen ein Medikament resistent ist, sondern auch gegen andere Arzneistoffe, mit denen sie noch gar nicht in Kontakt gekommen ist. Deshalb werden diese membrangebundenen Transporter-ATPasen codierenden Gene auch als Mehrfachresistenz-Gene oder „multidrug resistance gene“ bezeichnet. In einigen Publikationen konnte auch eine Überexpression solcher Mehrfachresistenz-Gene im Pankreaskarzinom nachgewiesen werden (Konig et al., 2005)

1.2. Proliferation

Eine Grundlage neoplastischer Progression stellt häufig die Fehlregulation der Proliferation dar. Ursache sind meist Mutationen in Genen, die für Proteine codieren, welche Knotenpunkte in der Regulation des Zellzyklus einnehmen. Vorwiegend zwei Familien von Schlüsselproteinen spielen eine wichtige Rolle im Kontrollsystem des Zellzyklus: Cycline und Cyclin-abhängige Proteinkinasen (Cdk). Die Cycline werden in mitotische und G1-Phase-Cycline unterteilt. Die mitotischen Cycline, zu denen auch das Cyclin B gehört, binden während der G2-Phase an Cdk und ermöglichen den Beginn der Mitose. G1-Phase-Cycline koppeln dagegen während der G1-Phase an Cdk und leiten den Übergang in die S-Phase ein.

Zu den negativen Zellzyklusregulatoren gehören Proteine der KIP/CIP-Familie: p27^{Kip}, p21^{WAF1/KIP1}. Beide Proteine binden an Cyclin-Cdk-Komplexe, inhibieren deren katalytische Aktivität und induzieren damit letztlich den Zell-Zyklus-Arrest.

Beeinflusst werden diese Zellzyklusregulatoren durch diverse Signalwege. Ein wichtiger proliferationsmodulierender Signalweg ist die Raf/Mek/Erk-Kaskade, die zu den Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Signalwegen (MAP-Kinase-Signalweg) gehört. Eine Aktivierung dieser Signalkaskade, die u.a. kontrolliert wird durch die zuvor schon erwähnte GTPase Ras, führt zur Transkription verschiedener Gene. Diese Gene codieren häufig für Proteine, die eine Zellproliferation forcieren. Zu diesen Proteinen gehört beispielsweise der Transkriptionsfaktor c-Myc.

Die Expression des Transkriptionsfaktors c-Myc beeinflusst ebenfalls diverse Gene, deren Produkte in Verbindung mit Zellproliferation und Differenzierung stehen. Ebenso korreliert der c-Myc-Gehalt häufig mit dem Gehalt der katalytisch aktiven Untereinheit der humanen Telomerase hTERT (Geng et al., 2003). Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, d.h. es besteht aus einer RNA- und einer Proteinkomponente. Dieses Enzym katalysiert die Verlängerung der Telomere eukaryotischer Chromosomen und hebt damit die stetige Verkürzung der Chromosomenenden infolge des „End-Replikations-Problems“ auf (Djojotubroto et al., 2003). Gesunde somatische Zellen zeigen keine Telomeraseaktivität. Aufgrunddessen kommt es im Zuge des Alterungsprozesses zum Erreichen einer kritischen Telomerlänge, die schließlich den Zelltod zur Folge hat. In den meisten humanen Tumoren kommt es hingegen zu einer Reaktivierung der Telomerase, wodurch folglich deren replikative Senescence umgangen werden kann. Die Telomeraseaktivität einer Zelllinie stellt mittlerweile ein gängiges Differenzierungsmerkmal dar.

1.3. Zelltod

Zellen sterben auf unterschiedliche Art und Weise. Man unterscheidet zwischen Nekrose (nicht programmierter Zelltod) und Apoptose (programmierter Zelltod). Im Folgenden wird kurz auf die Apoptose eingegangen.

Apoptose zur Eliminierung von Zellen ist ein wichtiges Ereignis in der Entwicklung, Erhaltung und Umgestaltung eines Organismus. Dieser durch pro- und antiapoptotische Proteine streng kontrollierte, energetisch aufwendige Prozess dient hauptsächlich zum Schutz des Gesamtorganismus, denn im Gegensatz zur Nekrose, bleibt die Zellmembran während der Apoptose intakt. Dadurch wird verhindert, dass der Zellinhalt ausgeschüttet wird und eine Entzündung hervorruft.

Folgende typische morphologische Veränderungen sind an einer apoptotischen Zelle zu erkennen: Abrundung der Zellen, Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Bildung von membranumschlossenen apoptotischen Körperchen.

Auslöser der Apoptose können toxische Substanzen oder ionisierende Strahlungen aber auch Liganden, die an entsprechenden Todesrezeptoren der Zelle binden, sein. Zu den Todesrezeptoren gehört u.a. der Fas-Rezeptor (auch CD95 genannt) (Itoh et al., 1991), der nach Aktivierung durch den entsprechenden Fas-Liganden eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzt (extrinsischer Weg). In der Regel führt dies immer zur Aktivierung von speziellen Proteasen (Caspasen), die aspartathaltige Aminosäuresequenzen im Substrat erkennen und diese spezifisch spalten. Durch die Spaltung werden diese Caspase-Substrate inaktiviert, was letztlich den Zelltod zur Folge hat.

Toxische Substanzen oder Strahlung induzieren dagegen den intrinsischen oder stressinduzierten Signalweg, der hauptsächlich über Mitochondrien vermittelt wird. Dabei kommt es infolge einer erhöhten Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zur Freilassung von Cytochrom C. Cytochrom C komplexiert mit verschiedenen Adaptorproteinen und inaktiven Caspasen zu einem Apoptosom, welches dann schließlich auch zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade führt.

Zu den Caspase-Substraten gehören zum Beispiel die Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) und Cytokeratin 18, deren Spaltung spezifische Spaltprodukte erzeugen. Die Detektion solcher Spaltprodukte ist eine gängige Nachweismethode der Apoptose.

1.4. Epithelgewebe

Das Epithelgewebe gehört neben dem Nerven-, Binde- und Muskelgewebe zu den vier Grundgewebearten bei Wirbeltieren. Das Epithel- oder auch Deckgewebe kleidet alle inneren und äußeren Oberflächen mit einer oder mehreren Zellschichten aus. Eine charakteristische Eigenschaft der Epithelzellen ist ihre Polarität. Infolge struktureller und funktioneller Eigenschaften unterscheidet man die apikale, basale und laterale Membran. Die apikale Seite ist dem Äußeren bzw. dem Lumen zugewandt und die basale ist über der Basalmembran mit dem darunterliegenden Gewebe verbunden. Die laterale Membran befindet sich seitlich und steht in Kontakt zur Nachbarmembran. Die Zellen des Epithelgewebes liegen dicht aneinander und sind durch reichliche Zellkontakte fest miteinander verbunden. Entsprechend gibt es nur kleine Interzellularräume im Epithelgewebe, weshalb auch nur wenig extrazelluläre Matrix vorhanden ist, die vorwiegend in Form der Basalmembran unterhalb der Zellen vorzufinden ist.

Je nach Organ nimmt das Epithelgewebe ganz unterschiedliche Funktionen ein. Immer übernimmt es auch eine Schutzfunktion gegenüber äußeren Einflüssen.

Durch spezielle Zellkontakte („tight junctions“) kann es auch als Barriere gegen den Fluss von Wasser, gelösten Substanzen und Zellen von einem Körperinnenraum zum anderen dienen (Forslind, 1994); (Leonova und Raphael, 1997). Im Darm trägt das Epithel die Funktion der Resorption, d.h. der Aufnahme bestimmter Stoffe aus dem Darmlumen und deren gerichteter Transport durch die Epithelzellen von apikal nach basal. Des weiteren übernimmt es Sekretions- und Sinnesfunktionen.

1.4.1. Polarisierung

Polarität bedeutet, dass die Zellen nicht rundherum gleich organisiert sind. Stattdessen unterscheiden sich mehrere Membranbereiche einer Zelle in ihrer Zusammensetzung sowie z. T. auch morphologisch und definieren damit die apikale, basale und laterale Seite der Zelle. Die Grundlage für diese Fähigkeit liegt in der Ausbildung einer komplexen „Sortiermaschinerie“, dem trans-Golgi-Netzwerk, wo zunächst der Bestimmungsort von Proteinen und Fettsäuren bestimmt wird, die dann in Form von Vesikeln entlang des Zytoskeletts an die Zielorte geliefert werden (Schuck und Simons, 2004). Wie bereits auch für die Tumorigenese beschrieben, kann auch die extrazelluläre Matrix Polarität und Morphogenese der Epithelzellen beeinflussen, z.B. durch deren Topologie (Berthiaume et al., 1996), Glycoproteine (Perry et al., 1999), Rezeptoren (Stahl et al., 1997), Zelladhäsionsmoleküle (Buxton und Magee, 1992) sowie durch Wachstumsfaktoren oder Hormone (Adamson, 1993).

Zellpolarität ist u. a. durch die definierte Ausbildung von Zellverbindungen charakterisiert, die man an vielen Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontaktstellen in allen Geweben vorfindet. Diese sorgen auch für die Aufrechterhaltung der Polarität, indem sie als Barriere zwischen apikaler und basolateraler Membran fungieren und so den Lipid- oder Protein-Austausch blockieren (van Meer und Simons, 1988).

Diese Zellverbindungen können nach ihrer Funktion in drei Klassen eingeteilt werden (Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage):

1. Undurchlässige Verbindungen („tight junctions“)
2. Haftverbindungen
 - 2.1. Anheftungsstellen für Actin-Filamente
 - a) Adhärenzverbindungen von Zelle zu Zellen
 - b) Adhärenzverbindungen von Zelle zu Matrix
 - 2.2. Anheftungsstellen für Intermediärfilamente
 - a) von Zelle zu Zellen (Desmosomen)
 - b) von Zelle zu Matrix (Hemidesmosomen)
3. Kommunizierende Verbindungen
 - a) „gap junctions“
 - b) chemische Synapsen

Im Kontext der eigenen Untersuchungen wird auf speziell ein Molekül der Adhärenzverbindung von Zelle zu Zelle näher eingegangen: CEACAM1 („carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule“¹).

1.4.1.1. CEACAM1

Die Proteine der CEACAM-Familie gehören zur Superfamilie der Immunglobuline. Alle CEACAM tragen eine große extrazelluläre N-terminale Polypeptidkette, die charakteristischerweise eine variable Immunglobulin-artige Domäne aufweist (Ig_v), auf die eine konstante Immunglobulin-artige Domäne (Ig_c) folgt. Soweit bekannt, sind alle CEACAM „singlepass“ – Transmembranproteine mit einer intrazellulären Domäne, die unterschiedlich lang sein kann (Obrink, 1997). Sie ist vermutlich an der Signalübertragung in der Zelle oder an der Aktin – Bindung beteiligt.

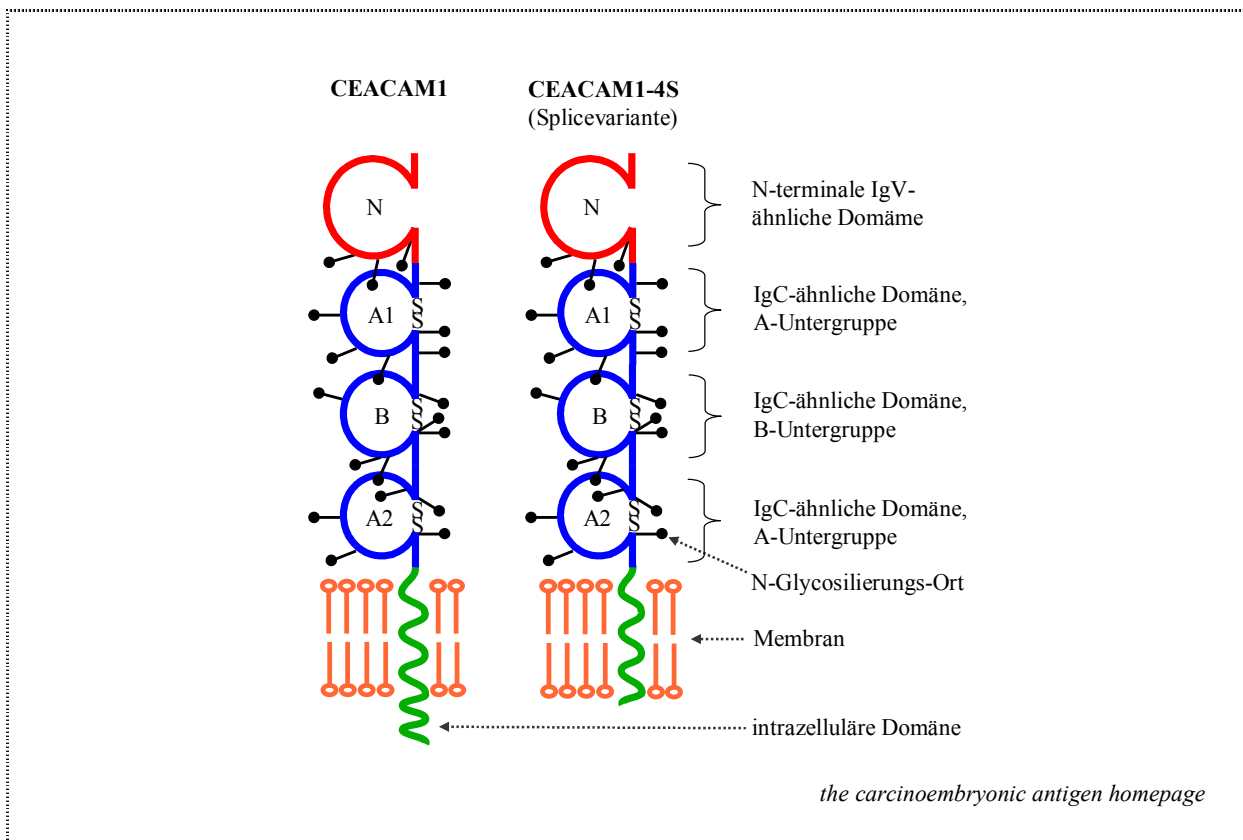


Abbildung 2: Schematische Darstellung von CEACAM1 und deren Splicevariante CEACAM1-4S

CEACAM1 wird auf epithelialen und endothelialen Zellen vieler humaner Gewebe exprimiert und gilt allgemein als tumorsuppressiv. Durch differentielles „splicen“ entstehen mehrere CEACAM1-Isoformen mit unterschiedlichen Domänen im extrazellulären als auch im Transmembran-Bereich, die entweder eine lange (CEACAM1-L) oder eine trunkierte zytoplasmatische Kette (CEACAM1-S) aufweisen. Während der Isoform CEACAM1-L eine inhibitorische Wirkung auf Colon-, Prostata-, Leber-, Endometrium- sowie Brust-Krebs nachgewiesen wurde, scheint auch die Ratio der beiden

Isoformen, die auch koexprimiert werden können, maßgeblich die Proliferation zu beeinflussen (Singer et al., 2000). Die lange zytoplasmatische Domäne interagiert z.B. mit Proteinen aus der Src-Tyrosin-Kinase-Familie (Brummer et al., 1995); (Skubitz et al., 1995). Sie trägt ein “immune receptor tyrosine-based inhibitory“ (ITI)-Motiv (Chen et al., 2001), welches für die wachstumshemmende Wirkung von CEACAM1 verantwortlich gemacht wird (Fournes et al., 2001), da es eine Verbindung zum Zytoskelett herstellt, die in Verbindung mit GTPasen aus der Rho-Familie für die korrekte Lokalisierung von CEACAM1 an den Zell-Zell-Kontakten zuständig ist (Sadekova et al., 2000).

Die CEACAM1-Expression wird in vielen Tumoren herunterreguliert, was mit einem Verlust der Zell-Polarität (Sadekova et al., 2000) sowie einer geringeren Apoptosesensitivität (Nittka et al., 2004) in Zusammenhang gebracht wird.

Eine morphoregulatorische Funktion von CEACAM1 konnte in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 gezeigt werden. Nach Transfektion der sonst CEACAM1-negativen MCF6-Zellen mit der kurzen CEACAM1-4S Isoform entwickelten diese unter 3D-Kulturbedingungen wieder einen normalen luminalen Phänotyp, der durch Apoptose zentraler Zellen hervorgerufen wurde (Kirshner et al., 2003).

1.4.1.2. Zytoskelett

Das Zytoskelett einer Zelle besteht aus einem komplexen Geflecht aus Proteinfilamenten und erstreckt sich über das gesamte Zytoplasma einer Zelle. Es verleiht der Zelle mechanische Stabilität und ermöglicht es ihr, verschiedene Formen anzunehmen sowie gerichtete Bewegungen auszuführen. Man unterscheidet drei Proteinfilamente im Zytoskelett: Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Aktin-Filamente. Alle drei Arten sind untereinander verbunden und interagieren miteinander.

Die Polarität einer Zelle wird vorwiegend durch das Zusammenwirken von Mikrotubuli und Aktin-Filamenten erzeugt, indem sie u.a. das Transportsystem für einen gerichteten Vesikelverkehr ausbilden.

1.4.1.3. Proteinsortierung und Vesikelverkehr

Membranständige und sezernierte Proteine tragen in der Regel ein Sortiersignal. Das kann z.B. eine im Allgemeinen 15 – 60 Aminosäure lange Sequenz sein, die abhängig vom Zielort unterschiedlich ausfällt. Dem reifen Protein wird diese Sequenz durch spezielle Signalpeptidasen abgespalten. Des weiteren können auch Signaltbereiche dem Protein als Sortiersignal dienen. Das können in der linearen Aminosäuresequenz auch weit voneinander entfernte Bereiche sein, die dem Protein eine bestimmte räumliche Anordnung verleihen. Die Signaltbereiche bleiben im Gegensatz zur Signalsequenz auch im reifen Protein bestehen.

Auch die Transportart des Proteins wird durch ein bestimmtes Transportsignal im Protein festgelegt, das von den entsprechenden Rezeptor-Proteinen im Zielorganell erkannt wird. Neben anderen verläuft ein Transportmechanismus über Vesikel (Kirchhausen, 2000a; Kirchhausen, 2000b) und findet vorwiegend beim Austausch zwischen ER und Golgi-Apparat statt, von wo aus die Proteine und

Lipide auf Plasmamembran, Lysosomen und sekretorische Vesikel verteilt werden. Der Golgi-Apparat unterteilt sich funktionell und biochemisch in drei verschiedene Kompartimente, die cis-, medial und trans-Zisternen. Im trans-Golgi-Netzwerk erfolgt letztlich die Aufteilung in die verschiedenen Transportvesikel, mit deren Hilfe die Proteine und Lipide zu ihrem Bestimmungsort gelangen.

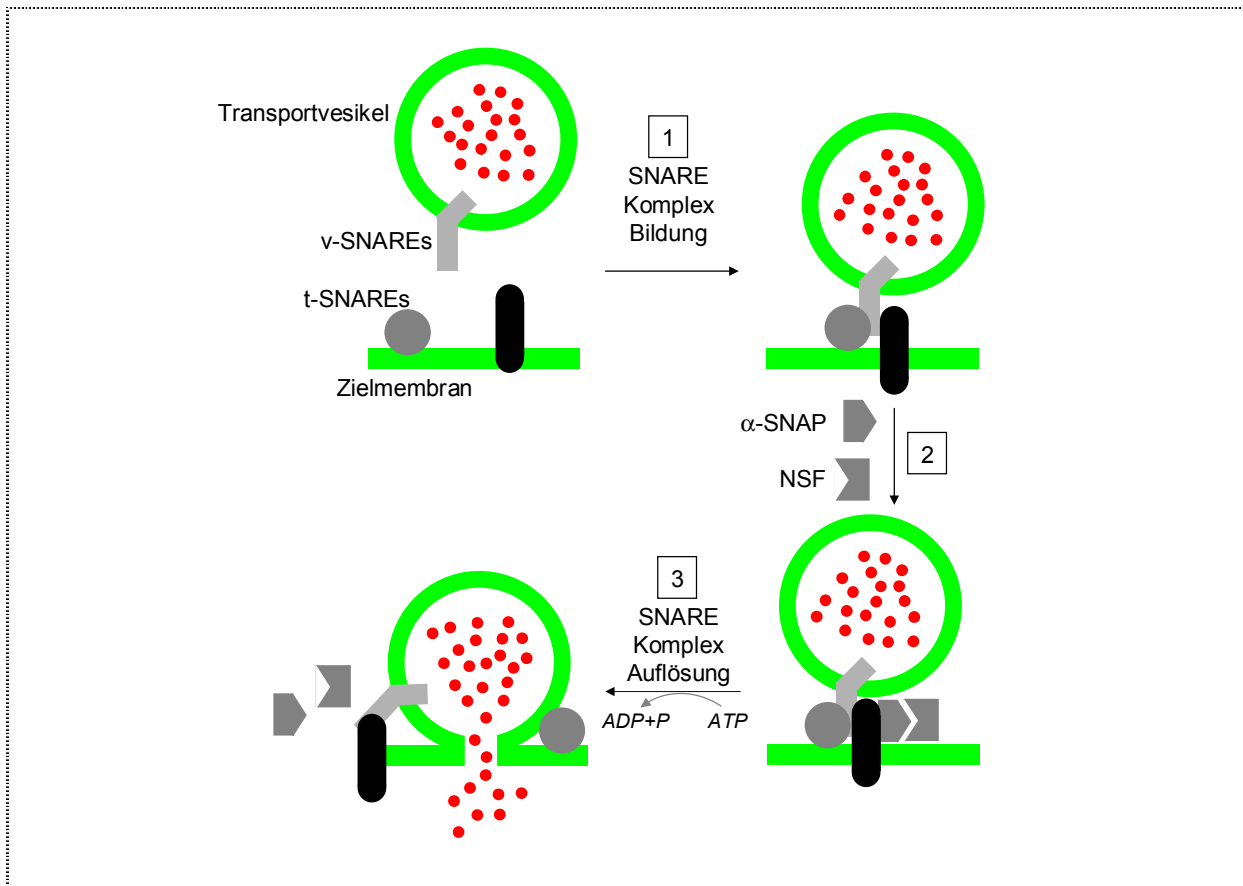


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Andockvorgangs eines Vesikels an die Zielmembran
Bild aus http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/snare.htm

Transportvesikel sind abgeschlossene Membranen, die von Proteinen ummantelt (coated) sind. Man unterscheidet zwischen Clathrin- und Coatomer-ummantelten Vesikeln. Während die Clathrin-Vesikel für den selektiven Transport zuständig sind, führen die Coatomer-Vesikel den nicht-selektiven Transport aus dem ER und den Golgi-Zisternen aus. Allgemein müssen „coated“ Vesikel ihre Hülle ablegen, bevor sie mit ihrer Zielmembran fusionieren können. Für das zielgerichtete Andocken der Transportvesikel dienen verschiedene Rezeptorproteine, die sowohl auf dem Vesikel als auch auf der Zielmembran vorhanden sind. Proteine, die dem Vesikel seine Spezifität verleihen, sind Rab- und v-SNARE-Proteine, wobei Rab-Proteine (GTPase) die Wechselwirkung von v-SNARE mit den komplementären t-SNARE-Proteinen unter GTP-Hydrolyse kontrolliert. Auf das Andocken muss nicht immer auch gleich die Fusion erfolgen. Bei einer regulierten Exozytose erfolgt erst bei einem entsprechenden extrazellulären Signal die Fusion der Membranen, die durch spezialisierte

Fusionsproteine katalysiert wird. Dieser energetisch ungünstige Prozess erfordert ATP, GTP, Acyl-CoA und andere Proteine, wobei die zwei Proteinkomponenten NSF (ATPase) und SNAP für die Einleitung der Fusion erforderlich sind.

Proteinkinase C (PKD oder PKC μ)

PKD oder PKC μ ist eine zytosolische Serin/Threonin-Kinase, die maßgeblich am Prozess der Proteinsortierung beteiligt ist, indem sie u.a. die Abschnürung der Transportvesikel vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) reguliert (Liljedahl et al., 2001). Der Einfluss des PKD ist vermutlich frachtspezifisch, d.h. es wirkt auf Transportvesikel, die ihre Fracht in unpolaren Zellen ganz allgemein zur Zelloberfläche transportieren. In polaren Zellen wurde beobachtet, dass PKD speziell den Transport von Proteinen reguliert, die in der basolateralen Membran vorzufinden sind (Yeaman et al., 2004).

Um diese regulierende Funktion ausüben zu können, erfordert dies die Rekrutierung des PKD an das TGN, was eine Aktivierung des PKD voraussetzt. Für die Bindung an das TGN ist die erste Cysteinreiche Domäne (C1a) im PKD, insbesondere das in dieser Region vorhandene Prolin 155, verantwortlich (Maeda et al., 2001). Weiterhin ist auch die Bindung von Diacylglycerol (DAG) an PKD für die Rekrutierung an das TGN von Bedeutung (Baron und Malhotra, 2002).

pp60c-src

Das Protein pp60c-src gehört zur Familie der Tyrosin-Kinasen. In geringen Mengen kommt dieses Protein in allen Geweben vor. Eine hohe Expression wurde dagegen im neuronalen Gewebe und in Thrombozyten nachgewiesen, was erstmals eine Beteiligung an der Vesikel-vermittelten Sekretion vermuten ließ (Sefton und Hunter, 1986). Diese Hypothese konnte im Rahmen weiterer Studien insofern untermauert werden, als dass verschiedene Vesikelmembran-Proteine, wie das in synaptischen Vesikeln vorkommende Protein Synaptophysin und Synaptogyrin aber auch das ubiquitär vorkommende Protein Cellugyrin, als Substrate des pp60c-src identifiziert werden konnten (Barnekow et al., 1990); (Janz und Sudhof, 1998). Weiterhin zeigten Ely et al. eine durch pp60c-src verursachte Erhöhung der Acetylcholinrezeptor-abhängigen Sekretion von Katecholamin, die vorwiegend über einen Liganden-gesteuerten Mechanismus verläuft (Ely et al., 1994).

Welche genaue Funktion das pp60c-src hier einnimmt, ist noch nicht geklärt. Aufgrund der häufig beobachteten Interaktion zwischen pp60c-src und Zytoskelett (Horvath et al., 1992), wurde die Hypothese aufgestellt, dass pp60c-src eine Rolle beim Zytoskelettabbau spielt, wodurch letztlich die Sekretion ermöglicht wird (Linstedt et al., 1992b).

1.4.1.4. Sphingolipide

Sphingolipide sind nicht nur Komponenten biologischer Membranen, sie sind ebenfalls bedeutsam in verschiedenen Signaltransduktionswegen. Heute weiß man, dass Sphingolipide „first“- und „second-messenger“-Funktionen in einigen Signalwegen einnehmen. Zudem haben sie eine wichtige Bedeutung in „lipid rafts“. „Lipid rafts“ sind Bereiche in der Zellmembran, in denen Proteine,

Cholesterol und meist ungesättigte und geradkettige Lipide besonders dicht und geordnet gepackt vorliegen. Sie dienen dem Transport von Lipiden und Proteinen, wobei sie wie Flöße in der Zellmembran schwimmen. Damit sind „lipid rafts“ auch maßgeblich an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt.

Ceramide und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sind die am besten untersuchten Sphingolipide. In vielen Systemen weisen Ceramide und S1P entgegengesetzte Effekte auf. Ceramide inhibieren meist die Proliferation und fördern die Apoptose, während S1P das Wachstum stimuliert und Apoptose unterdrückt (Futerman und Hannun, 2004).

Man nimmt an, dass einige Funktionen der Ceramide mit ihrem Vorkommen in „lipid rafts“ assoziiert sind, denn die Bildung von „lipid rafts“ reguliert z.B. die Aktivierung von Rezeptoren und Kinasen, indem sie den Transport solcher Proteine beeinflussen (Gulbins, 2003).

In diversen Publikationen wurde dem Ceramid auch eine Mediatorfunktion in der Regulation der Zelldifferenzierung sowie der Telomeraseaktivität zugeschrieben (Riboni et al., 1995); (Kravetska et al., 2003).

1.5. Das A818-6 „hollow sphere“ System als *in-vitro*

Differenzierungsmodell

Die Zelllinie A818 wurde aus Aszites einer Patientin mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas isoliert und subkloniert. Unter 3D-Kulturbedingungen, d.h. bei Inhibition der Substratadhärenz, zeigt der Subklon A818-6 im Gegensatz zu anderen Subklonen (z.B. A818-4 und andere PDAC-Zelllinien) die Fähigkeit zur Ausbildung einer Hohlkugel („hollow spheres“). Diese Hohlkugeln bestehen aus einer einzelligen Epithelschicht, die ein zentrales Lumen umgibt. Im Vergleich zum korrespondierenden „monolayer“ weisen die A818-6-Zellen in der „hollow sphere“-Struktur einen höheren Differenzierungsgrad auf. Im Folgenden wird nur eine kurze Zusammenfassung über den Untersuchungsstand dieser „hollow spheres“ geliefert. Detaillierte Ausführungen sind der Dissertation von L. Lehnert (Kiel, 2000) zu entnehmen.

Die Proliferation der „hollow sphere“-Zellen nimmt deutlich ab. Dies geht einher mit einer zunehmenden Expression des Zellzyklus-Inhibitors p27^{KIP} und einer Abnahme des Zellzyklus-Promotors Cyclin B. Die Färbung der Zelladhäsionsmoleküle E-cadherin und Beta-Catenin, die lateral vorzufinden sind, ergab, dass die Polarität der „hollow sphere“-Zellen wieder hergestellt ist. Da Laminin, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, auf der dem Lumen zugewandten Membranoberfläche detektiert werden konnte, stellt diese die basale Seite der Zellen dar. Die apikale

Oberfläche der Zellen ist dem Medium zugewandt, da einerseits Mucin-1⁴ und andererseits Mikrovilli auf der Oberfläche von „hollow spheres“ nachgewiesen werden konnte („inside-out“-Orientierung). Charakteristische Hinweise zur Malignität sind u. a. die Telomeraseaktivität, die in den „hollow spheres“ im Vergleich zum korrespondierenden „monolayer“ um das sechsfache reduziert war.

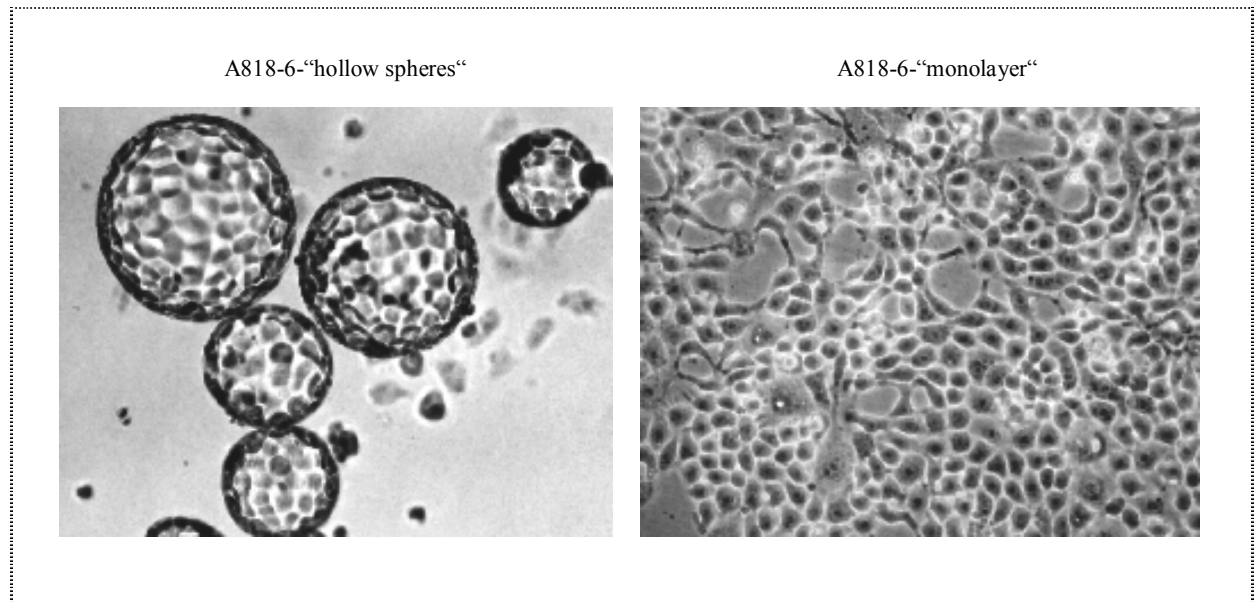


Abbildung 4: Morphologie A818-6-„hollow spheres“ vs. „monolayer“ (L. Lehnert et al., 2001)

Durch Kokultivierung der A818-6 mit mesenchymalen Zellen konnte eine Beschleunigung der Entwicklung und eine deutliche Vergrößerung der „hollow spheres“ erzielt werden.

Eine wichtige Rolle bei der „hollow sphere“-Entwicklung wurde dem Protein Epimorphin zugeschrieben, dessen morphoregulatorische Wirkung bereits in mehreren Zelltypen nachgewiesen wurde. Belegt wurde diese Hypothese durch die blockierende Wirkung eines neutralisierenden Epimorphin-Antikörpers auf die „hollow sphere“-Bildung. Des weiteren korrelierte auch das Expressionsmuster der Epimorphin-Isoformen verschiedener Zelllinie mit deren Fähigkeiten zur Lumenbildung.

1.6. Epimorphin

1992 wurde Epimorphin erstmals von Hirai als mesenchymales und morphoregulatorisches Protein beschrieben. Das Protein wurde mit dem monoklonalen Antikörper MC-1, der im Medium eine Inhibition der epithelialen Morphogenese bewirkte, aus der λ gt11 Expressions-Bibliothek identifiziert. Während der Antikörper MC-1 im Westernblot ein Protein mit der Größe von 150 kDa detektiert, codiert die cDNA des klonierten Epimorphins lediglich ein 34 kDa großes Protein (Hirai et al., 1992).

⁴ Mucin-1 wird *in-vivo* von den dukталen Zellen sezerniert und kleidet die apikale Oberfläche aus.

Datenbankanalysen ergaben, dass die Sequenz der 289 Aminosäuren des Epimorphins zu 63 % mit dem HPC-1-Antigen (SyntaxinA) identisch ist.

Die Familie der Syntaxine sind integrale Membranproteine, die in der Zelle an vesikulären Transportprozessen beteiligt sind. Diese Proteingruppe hat vier strukturelle Gemeinsamkeiten:

1. Das Fehlen eines aminoterminalen Signalpeptids
2. Eine Größe von ca. 290 Aminosäuren
3. Das Vorkommen von heptameren Wiederholungssequenzen
4. Eine carboxyterminale hydrophobe Domäne

Zwischen den heptameren Wiederholungssequenzen bilden sich „coiled-coil“-Strukturen aus. Diese Bereiche sind oft bei Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert (Pelham, 1993); (Spring et al., 1993).

Es sind drei Epimorphin-Isoformen identifiziert, die vermutlich durch alternatives „splicen“ entstehen (Bennett et al., 1993); (Hirai, 1993). Epimorphin I und II haben beide eine Größe von 34 kDa und unterscheiden sich nur geringfügig in der 3'-terminalen Sequenz. Epimorphin III hingegen fehlt die carboxyterminale hydrophobe Domäne und weist dementsprechend eine Größe von nur 31 kDa auf (Hirai, 1993).

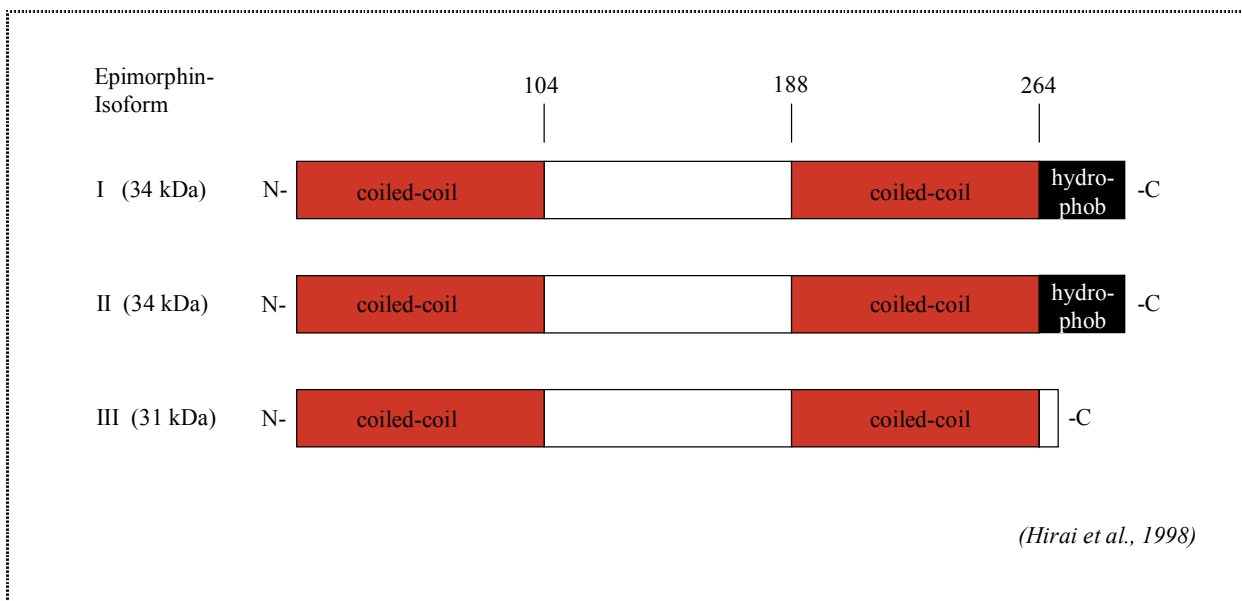


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Epimorphin-Isoformen

Die Epimorphin-Monomere können an den „coiled-coil“- Bereichen intermolekulare Wechselwirkungen eingehen, wodurch SDS-resistente Dimere (70 kDa) und Tetramere (150 kDa) entstehen (Yoshida et al., 1992); (Hirai, 1994). Die Komplexe zeigen andere antigene Eigenschaften als die Monomere. Das erklärt, warum der Antikörper MC-1 nur die 150 kDa Fraktion erkennt, während die monomeren Formen im Westernblot unentdeckt blieben.

Durch Immunisierung von verschiedenen Tieren mit einem Fusionsprotein, bestehend aus Epimorphin und Beta-Galaktosidase, konnte ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden, der auch die Monomere nachweist.

Mit dem Aggregationszustand von Epimorphin ändert sich vermutlich auch seine räumliche Verteilung. Man geht davon aus, dass die Monomere vorwiegend zytoplasmatisch und die tetramere Form meist auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (Hirai, 1994); (Butt et al., 1996).

Die Epimorphin-Expression wurde bereits in einigen Organen nachgewiesen, wo es auf unterschiedliche Weise in einen morphoregulatorischen Zusammenhang gebracht wurde.

Am besten untersucht wurde die Funktion des Epimorphins in der Brustepithelzell-Differenzierung. *In-vivo* ist es in stromalen Kompartimenten (z.B. Fibroblasten und myoepitheliale Zellen) vorzufinden, von wo aus es eine Schlüsselfunktion auf die Morphogenese der Brustepithelzellen ausübt.

Epimorphin initiiert nicht nur, sondern bestimmt auch die Morphogenese in Abhängigkeit davon, wie es den Zellen präsentiert wird. Ist die Epimorphin-Verteilung auf der Zelloberfläche überall gleichmäßig, bilden die Zellaggregate eine globuläre, alveolenähnliche Struktur mit einem großen Lumen aus.

Liegt Epimorphin den Zellen polarisiert vor, entwickelt sich ein verzweigtes Gangsystem.

Fehlt Epimorphin oder wird es z.B. durch den Antikörper MC-1 blockiert, so findet keine Morphogenese statt, was sich in der Ausbildung von Zellanhäufungen bemerkbar macht (Hirai et al., 1998).

Wie in der Brustepithelzell-Differenzierung wirkt Epimorphin auch auf Endothelzellen. Auch hier wird es nicht direkt von den Endothelzellen produziert, sondern von umliegenden Zellen, wie Pericyten und Fibroblasten, die direkt mit den Endothelzellen der Gefäße interagieren.

In-vitro richten sich die Endothelzellen in Anwesenheit von Epimorphin tandemartig aus und entwickeln Verzweigungen. Neben diesen morphologischen Veränderungen nimmt auch die Proliferation der Brustepithelzellen sowie der Endothelzellen ab.

Ähnlich beeinflusst Epimorphin auch die Morphologie von u. a. Hepatocyten (Hirose et al., 1996), die kleine hepatocytäre Sphäroide ausbilden (Hirose et al., 1996); (Watanabe et al., 1998), Epithelzellen der Lunge (Koshida und Hirai, 1997) oder Darmepithelzellen, die auf Epimorphin-überexprimierenden Myofibroblasten kokultiviert wurden (Fritsch et al., 2002).

Auch in der Entwicklung von Niere (Horikoshi et al., 2001), Haarfollikel (Akiyama et al., 1999) und in der Darm-Ontogenese, speziell während der Kryp-Villus-Morphogenese (Plateroti et al., 1998); (Goyal et al., 1998) spielt Epimorphin eine Rolle.

Zhang et al. wiesen Epimorphin 1998 in der Haut nach, wo es zwischen der Epidermis und Dermis verstärkt auftritt. Hier zog man erstmals eine Beteiligung von Epimorphin an der Proliferation von neoplastischen Epithelzellen in Erwägung (Zhang et al., 1998); (Zhang et al., 1999).

Die Wirkung von Epimorphin auf die Zellen erfolgt vermutlich einerseits direkt über Zell-Zell-Kontakt zwischen Epimorphin-exprimierender Zelle und Zielzelle und andererseits indirekt über die

Modulation der Sekretion von Cytokinen und/oder anderen Wachstumsfaktoren. Die Bindung von Epimorphin an die Zelloberfläche erfolgt über die zentral gelegene Aminosäuresequenz 105-123. Ein Peptid mit nur dieser Aminosäuresequenz kann zwar die Zellen binden, hat aber nicht den Effekt auf die Zellen wie das „full-length“-Protein (Oka und Hirai, 1996); (Koshida und Hirai, 1997). Ein Epimorphin bindender Rezeptor ist bisher noch nicht bekannt.

In Brustepithelzellen wird infolge einer apolaren Epimorphin-Präsentation (d.h. Epimorphin-Zugabe zum Medium) die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP-beta (CCAAT-enhancer binding protein) erhöht. C/EBP-beta-Transkriptionsfaktoren wurden erstmals als hitzestabile DNA-bindende Proteine in Rattenleberzellen entdeckt. Ihren Namen haben sie aufgrund ihrer selektiven Bindefähigkeit an CCAAT-Motife. Sie gehören, wie z.B. auch c-Jun und AP-1, zur großen Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle u. a. in der Zellzykluskontrolle, Karzinogenese, Leberregeneration und Apoptose. Hirai et al (Hirai et al., 2001) beobachtete eine C/EBP-beta-vermittelte Modulation der Apoptose in Brustepithelzellen. Zusätzlich konnte er beweisen, dass Epimorphin maßgeblich für diese Apoptosemodulation verantwortlich ist, denn Epimorphin führte in seinem System zu einer Steigerung der relativen Expression von LIP zu LAP, den beiden C/EBP-beta-Isoformen. Auch konnte er diesen Effekt in Zusammenhang mit der luminalen Morphogenese bringen, da eine moderate Expression von LIP zur Ausbildung eines zentralen Lumens führte. Eine geringe Expression von LIP führte hingegen zur Bildung von kompakten Sphäroiden, während bei einer zu hohen Expression der Zelltod überwog. Damit wurde Epimorphin von Hirai 2001 als erster „upstream effector“ von C/EBP-beta beschrieben (Hirai et al., 2001). Auch eine Zunahme sezernierter Metalloproteinasen, die für die Epimorphin-induzierte Verzweigung von Brustepithelzellen essentiell sind, wurde nach Epimorphin-Zugabe beobachtet (Simian et al., 2001).

In Endothelzellen und in epithelialen Zellen der Lunge wird durch Epimorphin die Sekretion von einigen Cytokinen, wie z.B. IL-6, gesteigert (Oka und Hirai, 1996); (Koshida und Hirai, 1997). Mit Hilfe von Epimorphin-überexprimierenden intestinalen Myofibroblasten konnte auch eine in den Hedghog-Signalweg eingreifende Funktion von Epimorphin nachgewiesen werden (Fritsch et al., 2002).

Noch ist nicht geklärt, wie diese Ergebnisse mit den Aufgaben von Syntaxinen, zu denen Epimorphin große Homologien zeigt, in Einklang zu bringen sind. Unbekannt ist auch, welche Isoform oder welcher Komplex für die morphoregulatorische Funktion verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass das Tetramer eine wichtige Rolle spielt, da der blockierende Antikörper MC-1 lediglich diesen auf der Zelloberfläche lokalisierten Komplex erkennt. Aber auch eine indirekte Wirkung des Epimorphin auf die Morphoregulation wird diskutiert, da es möglicherweise am intrazellulären Transport wichtiger Morphoregulatoren involviert ist.

1.7. Zielsetzung

A818-6 Zellen wachsen unter Standardkulturbedingungen als einschichtiger Zellrasen („monolayer“), wenn man diesen Zellen die Möglichkeit zur Substratadhärenz entzieht (3D-Kultur), entwickeln sie sich zu Hohlkugeln („hollow spheres“), bestehend aus einer einfachen Zellschicht, die ein zentrales Lumen umgibt.

Dieser Differenzierungsvorgang konnte durch einen neutralisierenden Epimorphin-Antikörper blockiert werden (Lehnert et al., 2001a). Epimorphin wurde bereits als morphoregulatorisches Protein charakterisiert, das insbesondere an der Lumenausbildung in der Brustepithelzell-Differenzierung eine Schlüsselrolle spielt (Hirai et al., 1992). Bisher sind drei Epimorphin-Isoformen bekannt, deren biologische Funktion noch relativ unerforscht ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Epimorphin-Expression in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien mittels Westernblot analysiert. Anhand dieser Daten konnte eine Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Lumenbildung unter 3D-Kulturbedingungen und dem Expressionsmuster der verschiedenen Epimorphin-Isoformen festgestellt werden.

Basierend auf diesen Beobachtungen sollten folgende Analysen durchgeführt werden:

1. Charakterisierung der morphoregulatorischen Funktion der verschiedenen Epimorphin-Isoformen im A818-System.

Dieses erforderte folgende Vorarbeiten:

- a) Umklonierung der drei Epimorphin-Isoformen in einen retroviralen Vektor.
- b) Einbringen der verschiedenen Epimorphin-Isoformen in den A818-Subklon, A818-4, mittels Transduktion der Epimorphin-codierenden DNA. Im Gegensatz zum Subklon A818-6 fehlt dem Subklon A818-4 die Fähigkeit zur Lumenbildung unter 3D-Kulturbedingungen. Stattdessen bilden die Zellen kompakte Zellaggregate aus. Hier sollte vornehmlich ein Augenmerk auf eine mögliche Induktion der Lumenbildung in A818-4 - Zellaggregaten unter 3D-Kulturbedingungen gelegt werden.
- c) Überexpression der verschiedenen Epimorphin-Isoformen in der lumenbildenden Zelllinie A818-6 mittels Transduktion. Anschließend sollte der mögliche weitere Einfluss der überexprimierten Isoformen auf den „hollow sphere“-Entwicklungsprozess beurteilt werden.

2. Untersuchungen zur biologischen Funktion der Epimorphin-Isoformen in dem A818-System.

Als Differenzierungskriterien sollten neben der morphologischen Beurteilung auch der Einfluss der Epimorphin-Isoformen auf die Proliferation, die Telomeraseaktivität und die Apoptosesensitivität analysiert werden.

- a) Zellzyklus-Analysen sowie die Expression von Zellzyklus-relevanten Proteinen sollten Aussagen über die Proliferation der Epimorphin-überexprimierenden A818-4- und A818-6-Zellen liefern.
- b) die Bestimmung der relativen Telomeraseaktivität der Epimorphin-überexprimierenden A818-4 und A818-6-Zellen sollte mittels „telomeric repeat amplification protocol“ (TRAP)-Assay erfolgen.
- c) Die Apoptoserate von Anti-CD95 (CH11) – stimulierten Epimorphin-überexprimierenden A818-4- und A818-6-Zellen sollte mittels Zellzyklus-Analysen ermittelt werden.

3. Allgemeine Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der „hollow sphere“-Bildung.

Vornehmlich sollte geklärt werden, inwieweit Apoptose bei der Lumenentstehung eine Rolle spielt. In Zusammenhang damit galt es, Untersuchungen zur Klärung der Bedeutung von CEACAM1 als auch des Sphingolipid-Signalwegs in der „hollow sphere“-Entwicklung durchzuführen.

- a) Untersuchungen zur Bedeutung von Zelladhäsionsmolekülen in dem Entwicklungsprozess sollten zunächst immunzytochemische und Westernblot - Analysen beinhalten, die Aussagen über die Expression und Lokalisation von CEACAM1 in Abhängigkeit vom Phänotyp liefern. Des weiteren sollte die Wirkung eines CEACAM1-Antikörpers auf die „hollow sphere“-Entwicklung untersucht werden.
- b) Untersuchungen zum Sphingolipid-Signalweg sollten vorerst die Wirkung von spezifischen Inhibitoren gegen Enzyme des Sphingolipid-Signalwegs auf die „hollow sphere“-Entwicklung beinhalten.

Zusammenfassend bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die physiologische Funktion des Proteins Epimorphin in dem A818-6-„hollow sphere“-System näher zu charakterisieren, um Rückschlüsse auf einen potentiell morphoregulatorischen Einfluss ziehen zu können. Begleitend dazu erforderte dies auch die Untersuchung allgemeiner Mechanismen, die für die Ausbildung der „hollow sphere“-Struktur essentiell respektive daran beteiligt sind.

2. Material und Methoden

Die Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Abcam	Cambridge, England
AGFA	Köln, Deutschland
Air Liquide Deutschland GmbH	Düsseldorf, Deutschland
Amersham Biosciences	Freiburg, Deutschland
Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Anamed Elektrophorese GmbH	Darmstadt-Arheilgen, Deutschland
Bachem Distribution Services GmbH	Weil am Rhein, Deutschland
BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
BD Falcon	Heidelberg, Deutschland
BD Pharmingen	Erembodegem, Belgien
BD Transduction Laboratories	Lexington, USA
Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
BioCarta, Inc.	San Diego, USA
Biometra GmbH i. L.	Goettingen, Deutschland
Bio-Rad	München, Deutschland
BioSource GmbH	Solingen, Deutschland
Biozym Laboratories	San Diego, USA
Boehringer	Mannheim, Deutschland
Biomedica	Bensheim, Deutschland
Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Calbiochem	Schwalbach, Deutschland
Cell Signaling Technology, Inc	Danvers, USA
Clontech	Heidelberg, Deutschland
Costar	Cambridge, USA
Dianova	Hamburg, Deutschland
Edmund Bühler GmbH	Tübingen, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
GATC-Biotech	Konstanz, Deutschland
GFL	Burgwedel, Deutschland
Gibco BRL	Eggenstein, Deutschland
Hellma	Müllheim, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland

Hilgenberg GmbH	Malsfeld, Deutschland
Hyclone Labs	Logan, USA
Invitrogen Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	Cambridgeshire, England
Köttermann	Uetze/Hänigsen, Deutschland
MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore GmbH	Schwalbach, Deutschland
Molecular Probes	Leiden, Niederlande
MWG-Biotch	Ebersberg, Deutschland
MP Biomedicals Inc.	Irvine, Kanada
MSE Technology Applications	Denver, USA
New England Biolabs	Frankfurt a. M., Deutschland
Nuaire	Fernwald, Deutschland
Nunc	Roskilde, Dänemark
Oncogene	Schwalbach, Deutschland
Perkin Elmer	Weiterstadt, Deutschland
Pierce	Rockford, USA
Polaroid	Offenbach, Deutschland
Promo Cell	Heidelberg, Deutschland
Promega	Mannheim, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche	Ingelheim, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Schärfe Systems GmbH	Reutlingen, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Stratagene	Heidelberg, Deutschland
TaKaRa	Madison, USA
Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim, Deutschland
VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Wallac	jetzt Perkin Elmer
Zeiss	Jena, Deutschland
Zymed	South San Francisco, USA

2.1. Epimorphin-Sequenzen

Grau unterlegte Sequenzen stellen die Primerhybridisierungsorte dar.

Epimorphin-Isoform I

5'-

CCATGCGGGACCGGCTGCCAGACCTGACGGCGTGTAGGAAGAATGATGATGGAGACACAGTTGTT
GTGGTTGAGAAAGATCATTTTCATGGATGATTTCTTCCATCAGGTGGAGGAGATTAGAAACAGTATT
GATAAAATAACTCAATATGTTGAAGAAGTAAAGAAAAACACAGCATCATTCTTTCTGCACCAAAC
CCGGAAGGAAAAATAAAAGAAGAGCTTGAAGATCTGAACAAAGAAATCAAGAAAACCTGCGAATA
AAATTGCAGCCAAGTTAAAGGCTATTGAACAAAGTTTTGATCAGGATGAGAGTGGGAACCGGACT
TCAGTGGATCTTCGGATACGAAGAACCCAGCATTTCGGTGCTGTCTCGGAAGTTTGTGGAAGCCATG
GCGGAGTACAATGAGGCACAGACTCTGTTTCGGGAGCGGAGCAAAGGCCGCATCCAGCGCCAGCT
GGAGATAACTGGGAGAACCACCACAGACGACGAGCTAGAAGAGATGCTGGAGAGCGGGAAGCCA
TCCATCTTCACTTCCGACATTATATCAGATTCACAAATTACTAGACAAGCTCTCAATGAAATCGAGT
CACGTCACAAGGACATCATGAAGCTGGAGACCAGCATCCGAGAGTTGCATGAGATGTTTCATGGAT
GGCTATGTTTGTGGAGACTCAGGGTGAAATGATCAACAACATAGAAAGAAATGTATGAATGCCAC
AGACTATGTAGAACACGCTAAAGAAGAAACAAAAAAGCTATCAAATATCAGAGCAAGGCAAGA
AGGAAAAAGTGGATAATTATTGCTGTGTCAGTGGTTCTGGTTGTCATAATCGTTCTAATTATTGGCT
TGTCAGTTGGCAAATGACCC-3'

Epimorphin-Isoform II

5'

CCATGCGGGACCGGCTGCCAGACCTGACGGCGTGTAGGAAGAATGATGATGGAGACACAGTTGTT
GTGGTTGAGAAAGATCATTTTCATGGATGATTTCTTCCATCAGGTGGAGGAGATTAGAAACAGTATT
GATAAAATAACTCAATATGTTGAAGAAGTAAAGAAAAACACAGCATCATTCTTTCTGCACCAAAC
CCGGAAGGAAAAATAAAAGAAGAGCTTGAAGATCTGAACAAAGAAATCAAGAAAACCTGCGAATA
AAATTCGAGCCAAGTTAAAGGCTATTGAACAAAGTTTTGATCAGGATGAGAGTGGGAACCGGACT
TCAGTGGATCTTCGGATACGAAGAACCCAGCATTTCGGTGCTGTCTCGGAAGTTTGTGGAAGCCATG
GCGGAGTACAATGAGGCACAGACTCTGTTTCGGGAGCGGAGCAAAGGCCGCATCCAGCGCCAGCT
GGAGATAACTGGGAGAACCACCACAGACGACGAGCTAGAAGAGATGCTGGAGAGCGGGAAGCCA
TCCATCTTCACTTCCGACATTATATCAGATTCACAAATTACTAGACAAGCTCTCAATGAAATCGAGT
CACGTCACAAGGACATCATGAAGCTGGAGACCAGCATCCGAGAGTTGCATGAGATGTTTCATGGAC
ATGGCTATGTTTGTGGAGACTCAGGGTGAAATGATCAACAACATAGAAAGAAATGTTATGAATGCC
ACAGACTATGTAGAACACGCTAAAGAAGAAACAAAAAAGCTATCAAATATCAGAGCAAGGCAA
GAAGGAAATTGATGTTTCATTATTATTTGTGTAATTGTTTTGCTTGTGATCCTTGGAATTATCCTAGC
AACAACATTGTCATAGCCC-3'

Epimorphin-Isoform III

5'

CCATGCGGGACCGGCTGCCAGACCTGACGGCGTGTAGGAAGAATGATGATGGAGACACAGTTGTT
GTGGTTGAGAAAGATCATTTTCATGGATGATTTCTTCCATCAGGTGGAGGAGATTAGAAACAGTATT
GATAAAATAACTCAATATGTTGAAGAAGTAAAGAAAAACCACAGCATCATTCTTTCTGCACCAAAC
CCGGAAGGAAAAATAAAAGAAGAGCTTGAAGATCTGAACAAAGAAATCAAGAAAACTGCGAATA
AAATTCGAGCCAAGTTAAAGGCTATTGAACAAAGTTTTGATCAGGATGAGAGTGGGAACCGGACT
TCAGTGGATCTTCGGATACGAAGAACCCAGCATTCGGTGCTGTCTCGGAAGTTTGTGGAAGCCATG
GCGGAGTACAATGAGGCACAGACTCTGTTTCGGGAGCGGAGCAAAGGCCGCATCCAGCGCCAGCT
GGAGATAACTGGGAGAACCACCACAGACGACGAGCTAGAAGAGATGCTGGAGAGCGGGAAGCCA
TCCATCTTCACTTCCGACATTATATCAGATTCACAAATTACTAGACAAGCTCTCAATGAAATCGAGT
CACGTCACAAGGACATCATGAAGCTGGAGACCAGCATCCGAGAGTTGCATGAGATGTTTCATGGAC
ATGGCTATGTTTGTGGAGACTCAGGGTGAATGATCAACAACATAGAAAGAAATGTTATGAATGCC
ACAGACTATGTAGAACACGCTAAAGAAGAAACAAAAAAGCTATCAAATATCAGAGCAAGGCAA
GAAGGCAACAACATTGTCATAGCAACCATATCCCAAGAGCCATTTATCCTTGACCC-3'

2.2. Plasmide

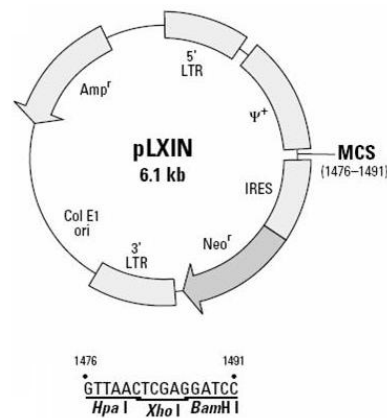


Abbildung 6: pLXIN (Clontech)

2.3. Konstrukte

Plasmid	Insert	Schnittstelle	Konstruktname	Hersteller
SRalpha	Humane Epimorphin Isoform I	unbekannt	SRalphaEpiI	Dr. Y. Hirai, Yokohama
SRalpha	Humane Epimorphin Isoform II	unbekannt	SRalphaEpiII	Dr. Y. Hirai, Yokohama
SRalpha	Humane Epimorphin Isoform III	unbekannt	SRalphaEpiIII	Dr. Y. Hirai, Yokohama
pLXIN	Humane Epimorphin Isoform I	HpaI	plxinEpiI	H. Papavlassopoulos
pLXIN	Humane Epimorphin Isoform II	HpaI	plxinEpiII	H. Papavlassopoulos
pLXIN	Humane Epimorphin Isoform III	HpaI	plxinEpiIII	H. Papavlassopoulos

2.4. Primersequenzen

Primername	Primersequenz (5' -> 3')	Sonstige Bemerkung
epi-5pan	ACC ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG	Vorwärtsprimer aller Epimorphin-Isoformen
epi-1-3p	GGG TCA TTT GCC AAC TGA CAA GCC AAT	Rückwärtsprimer für Epimorphin-IsoformI
epi-2-3p	GGG CTA TGA CAA TGT TGT TGC TAG GAT	Rückwärtsprimer für Epimorphin-IsoformII
epi-3-3p	GGG TCA AGG ATA AAT GGC TCT TGG GAT	Rückwärtsprimer für Epimorphin-IsoformIII
hSrc-for	GCT GCT CAG ATC GCC TCA GG	Vorwärtsprimer für humanes pp60c-src
hSrc-rev	CGC CTG TGC CTA GAG GTT CTC	Rückwärtsprimer für humanes pp60c-src
GAPDH-for	TCC ATG ACA ACT TTG GTA TCG TGG	Vorwärtsprimer für GAPDH
GAPDH-rev	GAC GCC TGC TTC ACC ACC TTC T	Rückwärtsprimer für GAPDH
TS mit 5'-TAMRA Modifikation	AAT CCG TCG AGC AGA GTT	TRAP-Assay
CX-ext	CTG CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TAA	TRAP-Assay
pIRES-RP	TAT AGA CAA ACG CAC ACC G	3'-Primer für den Vektor pLXIN

Die Oligosynthese wurde von MWG oder GATC Biotech durchgeführt.

2.5. Antikörper

Antikörper	Klon/Hersteller	Methode	Ausgangs-Konzentration	Verdünnung bzw. Konz.	Sekundär-Antikörper
Acid Ceramidase	23 BD Transduction Laboratories	WB	250 µg/ml	1:250	Anti-Maus
Agarose-konjugiert Pp60c-src	327 Calbiochem	IP/o-IP	1 mg/0,5 ml Agarose in PBS	20 µg	
Bcl-2	C2 Santa Cruz Biotechnology	WB	200 µg/ml	1:100	Anti-Maus
Bcl-xL	Polyklonal BD Pharmingen	WB		1:1000	Anti-Kaninchen
Beta-Aktin		ICC			
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	WB		1:2000	Anti-Maus
Beta-Catenin	BD Transduction Laboratories	ICC	0,25 mg/ml	1:100	Anti-Maus
		WB		1:500	
Bid	Polyklonal BioCarta, Inc.	WB		1:1500	Anti-Kaninchen
CD95	7C11 Immunotech	Durchfluss-zytometrie	200 ng/ml	2 µg/100 µl	Anti-Maus
		<i>In-vitro</i> -Zellkultur		50 ng/ml	
CEACAM1	4D1C2 Dr. Wagener (UKE, Hamburg)	ICC	1 µg/µl	1:100	Anti-Maus
		WB		1:1000	
		<i>In-vitro</i> Zellkultur		20-100 µg/ml	
C/EBPbeta	Santa Cruz Biotechnology	WB	200 µg/ml	1:200	Anti-Kaninchen
c-Myc	C-19 Santa Cruz Biotechnology	WB	200 µg/ml	1:200	Anti-Kaninchen
Cyclin B	BD Transduction Laboratories	WB	250 µg/ml	1:1000	Anti-Maus

Antikörper	Klon/Hersteller	Methode	Ausgangs-Konz.	Verd. bzw. Konz.	Sekundär-Antikörper
Epimorphin	IgG	ICC	2 µg/µl	1:100	Anti-Ratte
	Dr. Hirai (Yokohama)	<i>In-vitro</i> -Zellkultur		100 µg/ml	
	Polyklonal Dr. Hirai (Yokohama)	WB	n. d.	1:1000	Anti-Kaninchen
	IgM Dr. Hirai (Yokohama)	Durchfluss-zytometrie	2 µg/µl	1:100	Anti-Ratte
M30 CytoDEATH Fluorescein	M30 Roche	ICC		1:250	
		Durchfluss-zytometrie		1:250	
p21 ^{WAF1/KIP1}	6B6 BD Pharmingen	WB		1-2 µg/ml	Anti-Maus
p27 ^{KIP1}	BD Transduction Laboratories	WB	250 µg/ml	1:2500	Anti-Maus
p38	5F11 Cell Signaling	WB		1:1000	Anti-Maus
p42/44	Cell Signaling	WB		1:1000	Anti-Maus
PARP	C-2-10 Oncogene	WB	100 µg/ml	1:100	Anti-Maus
Phospho p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling	WB		1:1000	Ant-Rabbit
Phospho p42/44	Cell Signaling	WB		1:1000	Anti-Maus
pp60c-src	327 Calbiochem	WB		2,5 µg/ml	Anti-Maus
SNAP 23	Polyklonal Abcam	WB		1:1000	Anti-Kaninchen
		ICC		1:50	
Src pY ⁴¹⁸	Polyklonal Biosource	ICC		1:100	Anti-Kaninchen
		WB		1:1000	Anti-Kaninchen
Src Y ⁵²⁹	Polyklonal Biosource	WB		1:1000	Anti-Kaninchen
ZO-2	Polyklonal Zymed	ICC	0,25 mg/ml		Anti-Kaninchen

Die Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper wurden entweder von Molecular Probes oder Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. bezogen. Die HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper für die Westernblot-Analysen waren von der Firma Amersham Biosciences.

2.6. Inhibitoren für die Zellkultur

Inhibitor	Hersteller	Lösungsmittel
Caspase-Inhibitor III	Calbiochem	DMSO
Desipramin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Methanol
Fumonisin B1	Calbiochem	DMSO
Herbimycin A	Calbiochem	DMSO
Gö6983	Calbiochem	DMSO
3-Methyladenin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH-	Medium
U0126	Promega	DMSO
N-Oleoyl Ethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Ethanol
SB202190	Calbiochem	DMSO
zVAD-fmk	Bachem Distribution Services GmbH	Ethanol
zFA-fmk	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	DMSO

2.7. Generierung der Epimorphin-codierenden DNA mittels PCR

Prinzip

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) kann mit Hilfe entsprechender Primer eine spezifische DNA-Sequenz nachgewiesen bzw. amplifiziert werden. Dazu wird die DNA-Matrize in aufeinander folgenden Zyklen von Denaturierung, „primer annealing“ und Elongation exponentiell vermehrt ($c_n = c_0(1+x)^n$; c_n Konzentration der amplifizierten DNA, c_0 Konzentration der DNA-Matrize, x Amplifikationseffizienz, n Zyklenanzahl). Entwickelt wurde die Methode von Mullis (Mullis, 1990).

Die Epimorphin-codierende DNA lag uns als Insert in dem Vektor SRalpha vor und wurde uns freundlicherweise von Dr. Y. Hirai (Yokohama, Japan) zur Verfügung gestellt. Für die Umklonierung in einen retroviralen Vektor wurde das entsprechende Insert mit Hilfe der PCR zunächst amplifiziert. Um die Fehlerrate während der Amplifikation weitestgehend zu minimieren, wurde statt der sonst üblichen Taq-Polymerase die Pfu-Polymerase eingesetzt, da diese eine 3'-5'-"proofreading"-Aktivität aufweist und glatte Enden erzeugt.

Material

Pfu DNA-PCR-Puffer (Stratagene), dNTPs (Invitrogen Life Technologies), Vorwärtsprimer: alle Epimorphin-Isoformen (epi-5pan), Rückwärtsprimer: Epimorphin-Isoform I (epi-1-3p), Epimorphin-Isoform II (epi-2-3p) und Epimorphin-Isoform III (epi-3-3p), dH₂O, DNA-Template: SRalphaEpiI, SRalphaEpiII und SRalphaEpiIII (Dr. Y. Hirai, Yokohama), Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene), 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäße (Eppendorf), Thermocycler (Personal Cyclor, Biometra).

Durchführung

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen [µl]
Pfu DNA-PCR-Puffer	10X	1X	5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1
Vorwärtsprimer	25 µM	0,5 µM	1
Rückwärtsprimer	25 µM	0,5 µM	1
dH ₂ O		ad. 50 µl	40
Pfu-Polymerase	2,5 U/µl	2,5 U	1
auf 80 °C im Thermocycler erhitzt, dann Zugabe der Template-DNA			
Template-DNA	50 ng/µl	50 ng	1

Für die Amplifikation der Epimorphin-codierenden DNA wurde folgendes Programm gewählt:

Denaturierung:	1'95°C
„primer-annealing“ mit „touchdown“:	1'65/63/61/59/57°C jeweils zwei Zyklen, 55°C 20 Zyklen
Elongation:	1'72°C

Anschließend wurde der PCR-Ansatz zur Auswertung in der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

2.8. Auftrennung der Nukleinsäure mittels Agarosegel-Elektrophorese

Prinzip

Agarose bildet abhängig von seiner Konzentration eine mehr oder weniger feine Siebstruktur. Im elektrischen Feld bieten die Poren längeren DNA-Fragmenten einen höheren Widerstand als kürzeren. Die Laufstrecke eines Fragments ist demnach umgekehrt proportional zur Fragmentlänge. Zur Anfärbung der DNA nach der Elektrophorese wird ein in die DNA-Helix interkalierender Farbstoff gewählt, der unter UV-Licht sichtbar ist. Zu diesen Farbstoffen gehören z.B. Ethidiumbromid oder SybrGreen.

Material

Agarose (Invitrogen Life Technologies), Tris-Base (Carl Roth GmbH), HCl (Carl Roth GmbH), Natriumacetat (Merck), EDTA (Merck), Ethidiumbromid (Serva), 10X Ladepuffer blue juice (MBI Fermentas GmbH), 1 kb DNA-Längenmarker (MBI Fermentas GmbH), horizontale Elektrophoresekammer (MWG-Biotech), Spannungsgerät (Biometra), UV-Lampe, Kamera, Filme (Polaroid)

Durchführung

1XTAE-Puffer: 40 mM Tris HCl, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA (pH 8,0)

Agarose wurde in einer Konzentration von 1- 2 % in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Zum Anfärben der DNA wurde der Agaroselösung kurz vor dem Erhitzen Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt und schließlich in einen Elektrophoreseschlitten mit einem Kamm, der die Taschen für die Proben liefert, gegossen. Nach dem Aushärten der Agarose wurde der Schlitten in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer gelegt und der Kamm gezogen. Die Taschen wurden nun mit den Proben, verdünnt in einem Auftragspuffer, beladen. Der Auftragspuffer erleichtert das Auftragen der DNA-Probe, da das enthaltene Glycerin, Sucrose oder Ficoll die Dichte erhöht. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Gele mit einer Größe von 6,5 cm x 10 cm liefen bei ca. 60 V, 11 cm x 14 cm Gele liefen dagegen bei ca. 100 V. Auftrennungsdauer war abhängig von der erwarteten DNA-Fragmentgröße. Nach dem Lauf wurden die Gele unter UV-Licht begutachtet und fotografiert.

2.9. Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel

Prinzip

Zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente wurde die DNA-Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Material

QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen), Ethanol (Merck), Thermomixer 5436 oder 5437 (Eppendorf) (50°C) Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf)

Durchführung

nach Herstellerangaben (<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/pdf/QQ05.pdf>)

2.10. Phenol-Chloroform-Extraktion

Prinzip

Die Extraktion wird zur Reinigung von Nukleinsäurelösungen durchgeführt. Dazu wird die Lösung mehrmals mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) ausgeschüttelt. Die Verschmutzungen, meist Proteine, werden dadurch denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase oder Phenolphase an, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase vorzufinden sind. Durch vorsichtiges Abpipettieren kann man die wässrige Phase von der organischen trennen. Phenolreste werden mit einer anschließenden Alkoholfällung entfernt.

Material

dH₂O Phenol/Chlorform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) (Carl Roth GmbH), Phase Lock GelTMLight, 2ml (Eppendorf), Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf). 1,5 ml-Gefäß (Sarstedt)

Durchführung

Für die Extraktion wurden spezielle 2 ml Reaktionsgefäße, die die Trennung der verschiedenen Phasen voneinander erleichtert, eingesetzt. Vor Gebrauch wurden die Reaktionsgefäße für 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert, um das darin enthaltene Gel auf den Gefäßboden zu bekommen. Anschließend wurde die Nukleinsäurelösung in die Reaktionsgefäße überführt und mit H₂O auf ein Volumen von 250 µl eingestellt. Das gleiche Volumen (250µl) an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung wurde zu den Proben pipettiert. Anschließend wurde der Ansatz geschüttelt und für fünf Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Gel setzt sich während der Zentrifugation zwischen der organischen und wässrigen Phase ab. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt und zur Alkoholfällung eingesetzt.

2.11. Alkohol-Fällung der DNA

Prinzip

Durch die Zugabe von monovalenten Kationen und Alkohol zur Nukleinsäurelösung kommt es zur Konformationsänderung der DNA, die zu deren Ausfällung führt.

Material

Natriumacetat (Merck), Ethanol (96-100 %) (Merck), Ethanol (70 %) (Merck), dH₂O, Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf).

Durchführung

Natriumacetat-Lösung: 3 M Natriumacetat (pH 5)

Zur DNA-Lösung wurden 0,1 Volumen Natriumacetat-Lösung und 2 Volumen eiskaltes Ethanol (absolut) gegeben. Zur quantitativen Fällung wurde der Ansatz nochmals für ca. 15 Minuten bei -80 °C gelagert, bevor er dann für 30 Minuten bei 14000 rpm, 4 °C, zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das Pellet in 20 µl H₂O resuspendiert.

2.12. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Prinzip

Doppelsträngige Nukleinsäure weist im Durchschnitt bei einer Konzentration von 50 µg/ml eine Absorption von 1 bei 260 nm auf. RNA ergibt schon bei 33 µg/ml eine Absorption von 1 bei 260 nm. Mittels dieser Durchschnittswerte kann auf diese Weise relativ einfach die Konzentration anhand der Absorption errechnet werden.

Material

dH₂O, Präzisionsküvette aus Quarzharz (Hellma), Photometer (RNA/DNA-Calculator, Gene QuantII, Amersham Pharmacia Biotech)

Durchführung

Die DNA- oder RNA-Lösung wurde in einem geeigneten Volumen H₂O verdünnt (1:70). Dieser Verdünnungsfaktor wurde bei Beginn der Messung in das Photometer eingegeben. Als Leerwert wurde reines H₂O eingesetzt. Die Absorption der Proben wurde bei den Wellenlängen 260 und 280 in einer Quarzküvette gemessen. Mithilfe des Verdünnungsfaktors, dem Referenzwert aus dem Leerwert und der Absorption der Probe kann die Software des Photometers direkt die DNA- oder RNA-Konzentration in ng/ml errechnen. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde anhand des Verhältnisses OD₂₆₀/OD₂₈₀ verifiziert.

2.13. Ligation der DNA-Fragmente in den retroviralen Vektor pLXIN

Restriktionsverdau

Prinzip

Das Schneiden von DNA an definierten Positionen ist durch den Gebrauch von sogenannten Restriktionsendonukleasen möglich. Ursprünglich stammen diese Enzyme aus den verschiedensten Bakterien und dienen dort zum Schutz vor fremder DNA. Die Unterscheidung zwischen bakterieneigener und fremder DNA erfolgt anhand des spezifischen Methylierungsmuster. Fremde

DNA ist unmethyliert und wird von den Restriktionsendonukleasen zerschnitten. Speziell die Typ II Restriktionsenzyme sind für die Molekularbiologie von Bedeutung, da sie an genau definierten DNA-Sequenzen schneiden.

Ligation

Prinzip

Für eine erfolgreiche Ligation sind kompatible Enden von Vektor und DNA-Fragment Voraussetzung. Dazu werden sowohl Fragment als auch Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Bei Verwendung von PCR-Produkten mit glatten Enden („blunt-end“) schneidet man den Vektor mit Hilfe eines Restriktionsenzym, das glatte Enden erzeugt. Für die Ligationsreaktion wird meist die T4 DNA Ligase eingesetzt, die relativ genügsam in ihren Pufferbedingungen ist, lediglich ATP muss vorhanden sein. Für eine effiziente Ligation wird empfohlen, ungefähr fünfmal mehr Moleküle an DNA-Fragment als Vektor einzusetzen.

Material

dH₂O, T4 DNA Ligase (Invitrogen Life Technologies), Ligationspuffer (Invitrogen Life Technologies), Vektor (pLXIN) (Clontech), DNA-Fragment (Epimorphin-Isoform I bis III), HpaI (Roche)

Durchführung

Unüblicherweise wurde der Restriktionsverdau des Vektors mit der Ligation in einem Ansatz durchgeführt, da sich diese Methode als erfolgreich erwies.

Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen [µl]
Ligationspuffer	10X	1X	2
DNA-Fragment	50 ng/µl	200 ng/20 µl	4
Vektor	50 ng/µl	50 ng/20 µl	1
dH ₂ O		ad. 20 µl	11
T4-Ligase	2500 U/ml	2,5 U	1
HpaI	3-10 U/µl		1

Inkubation für 4 h bei Raumtemperatur. Der Ansatz wurde dann direkt für die Transformation genutzt.

2.14. Transformation der DNA in *Escherichia coli*

Prinzip

Um Plasmide anzureichern, werden sie zunächst in Bakterien eingeschleust, die dann vermehrt werden. Dazu müssen als erstes die Bakterien aufnahmefähig oder kompetent gemacht werden. Die Herstellung kompetenter Zellen kann z.B. über Elektroporation oder mittels der Calciumchlorid-

Methode erfolgen. Für die Transformation werden die kompetenten Bakterien mit der zu transformierenden Plasmid-DNA zunächst auf Eis inkubiert und dann einem Hitzeschock unterzogen. Die Anzüchtung der Bakterien erfolgt in einem selektiven Medium, so dass nur die Bakterien wachsen, die das Plasmid mit dem Resistenzgen tragen. Es folgt ein Screening nach Bakterienklonen, die das Plasmid mit dem gewünschten Insert enthalten. Diese werden schließlich vermehrt, um dann aus ihnen die DNA zu isolieren.

Material

Kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10F (Invitrogen Life Technologies), Ligationsansatz, Ampicillin (100 mg/ml) (Life Technologies), SOC-Medium (Invitrogen Life Technologies), LB-Bouillion (Merck), Bacto-Agar (Difco Lab), 10 cm-Platten (Sarstedt), Thermomixer 5436 oder 5437 (Eppendorf), Wasserbad (Heraeus), Brutschrank (Heraeus)

Durchführung

LB-Agarplatten: 25 g/l LB-Bouillion, 16 g Bacto-Agar und H₂O ad 1 L, autoklaviert. Kurz vorm Erhärten erfolgte die Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100 µg/ml) und anschließend wurde der Agar auf 10 cm-Platten gegossen.

Für die Transformation wurden kommerziell erhältliche kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10F') verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Dann folgte die Zugabe des Ligationsansatzes mit der Plasmid-DNA und eine 30minütige Inkubation auf Eis. Der Transformationsansatz wurde dann für 30 Sekunden in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad gestellt und anschließend sofort wieder auf Eis gelagert. Nach zwei Minuten wurden 250 µl SOC-Medium, das bereits auf 37 °C vorgewärmt wurde, dazu pipettiert. Der Ansatz wurde dann für eine Stunde bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht in den Brutschrank bei 37 °C gestellt.

2.15. Screening nach positiven Klonen

Prinzip

Da möglicherweise auch Ampicillin-resistente Kolonien wachsen, die lediglich den Vektor ohne Insert enthalten, müssen diese zunächst auf den Erhalt des Inserts überprüft werden.

Material

Steriles dH₂O, Ampicillin-resistente Kolonien hervorgegangen aus der oben beschriebenen Transformation (siehe 2.14), sterile Pipettenspitzen (Sarstedt), Thermomixer 5436 oder 5437 (Eppendorf) (95 °C)

Durchführung

Die nach der Transformation gewachsenen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in je ein Reaktionsgefäß mit 50 µl und 400 µl H₂O überführt. Der 400 µl-Ansatz wurde in einem Thermoblock für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und für die darauffolgende PCR, die zum Nachweis positiver Klone benötigt wurde, eingesetzt. Der 50 µl-Ansatz wurde bei 4 °C aufbewahrt und diente später zur weiteren Vermehrung der gewünschten Klone.

2.16. PCR zum Nachweis positiver Klone und der richtigen Orientierung des Inserts im Vektor

Prinzip

Da für die Ligation Restriktionsenzyme verwendet wurden, die glatte Schnittstellen erzeugen, musste die Orientierung des ligierten DNA-Fragments noch festgestellt werden. Denn für eine sinnvolle Transkription der Insert-Sequenz, muss es mit seinem Startcodon (ATG) in richtiger Orientierung zum Promotor liegen. Dieses kann mit Hilfe einer PCR oder mittels Restriktionsverdau ermittelt werden.

In diesem Fall wurde das Screening nach positiven Klonen mit dem Nachweis der richtigen Orientierung verbunden. Dazu benötigt man entsprechende Primerkombinationen, wodurch letztlich nur das Insert amplifiziert wurde, das auch in der gewünschten Orientierung vorlag. Durch den Einsatz eines Primerpaares, bei dem ein Primer zur Insert-Sequenz und der andere zur Vektor-Sequenz komplementär sind, kann auf relativ einfache Weise die Orientierung des Inserts festgestellt werden. Erhält man ein PCR-Produkt in entsprechender Größe, liegt das Insert in der richtigen Orientierung vor. Entsteht kein Produkt, ist entweder kein Insert vorhanden oder aber nicht in der gewünschten Orientierung vorliegend.

Material

PCR-Puffer minus Magnesium (Gibco BRL), *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL), Magnesiumchlorid (Gibco BRL), dNTPs (Invitrogen Life Technologies), Vorwärtsprimer (epi-5pan), Rückwärtsprimer (pIRES-RP), DNA-Template war der 400 µl-Ansatz mit den aufgenommenen Klonen, dH₂O, 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Eppendorf), PCR-Cycler (Personalcycler, Biometra)

Durchführung

Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen [µl]
Taq DNA-PCR-Puffer	10X	1X	5
Magnesiumchlorid	50 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1
Vorwärtsprimer	25 µM	0,5 µM	1
Rückwärtsprimer	25 µM	0,5 µM	1
dH ₂ O		ad. 50 µl	35
Taq-Polymerase	5 U/µl	2,5 U	0,5
auf 80°C im Thermocycler erhitzt, dann Zugabe der Template-DNA			
Template-DNA	n.d.	n.d.	5

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA-Template eingesetzt.

PCR-Programm:

Denaturierung:	1'95°C
„primer-annealing“ mit „touchdown“:	1'65/63/61/59/57°C jeweils zwei Zyklen, 55°C 20 Zyklen
Elongation:	1'72°C

Die 50 µl-Aliquots der aus der PCR hervorgegangenen positiven Klone (siehe 2.15) - mit dem Insert in der gewünschten Orientierung - wurden schließlich für die weiteren Arbeiten eingesetzt.

2.17. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Prinzip

Mit Hilfe kommerziell erhältlicher Plasmid-DNA-Reinigungskits von Qiagen wurden die Bakterien nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Bei stark alkalischem pH denaturiert die DNA, wobei die Plasmid-DNA nach Neutralisierung wieder hybridisiert, während die große chromosomale DNA der Bakterien einzelsträngig bleibt und ausfällt. Nach Abzentrifugation wird der Überstand mit der Plasmid-DNA auf eine Silikamatrix-Säule gegeben, an die die DNA bindet. Nach dem Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer wird die DNA mit TE-Puffer oder H₂O eluiert.

Material

Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen), LB-Bouillion (Merck), Ampicillin (100 mg/ml) (Life Technologies), Ethanol (Merck), 37°C-Inkubator mit Schüttelfunktion (TH30, Edmund Bühler), Zentrifuge (Biofugestratos, Heraeus)

Durchführung

LB-Medium: 25 g/l LB-Bouillion und H₂O ad 1 L, autoklaviert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100 µg/ml).

Die aufgenommenen Bakterien aus dem 50 µl-Aliquot wurden in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C und leichtem Schütteln vermehrt.

Die Plasmid-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Qiagen.

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/PlasmidDNAPurification/PLS_EndoFree/1032424_HB_EndoFree_072005.pdf

2.18. Sequenzierung von DNA

Prinzip

Prinzipiell existieren zwei verschiedene Methoden zur Sequenzierung von Nukleinsäuren: das chemische Verfahren von Maxam und Gilbert (Maxam und Gilbert, 1977) und das biochemische Verfahren von Sanger (Sanger et al., 1977). Bei Ersterem wird die DNA basenspezifisch durch chemische Agenzien gespalten. Bei der Methode nach Sanger wird eine DNA-Polymerisation mit Dideoxynukleotiden durchgeführt, wobei es je nach Ansatz zu einem Abbruch der Polymerisation nach einer bestimmten Base kommt. Bei beiden Methoden entstehen Oligonukleotide mit einem definierten Nukleotid am 3'-Ende, die auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können und so die DNA-Sequenz offenbaren.

Durchführung

DNA-Sequenzierungen wurden entweder von MWG-Biotech AG oder GATC-Biotech ausgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit Hilfe von BLASTN (Version 2.2.4, NCBI) verglichen und überprüft.

2.19. Isolierung genomischer DNA aus A818-6 und A818-4

Prinzip

Zur Isolierung der genomischen DNA müssen zunächst die Zellen und Nuklei lysiert werden, darauf folgt die Bindung der genomischen DNA an Anionen-Austauscher unter geeigneten Niedrig-Salz- und pH-Bedingungen. Die DNA wird von RNA, Proteinen und anderen niedermolekularen Molekülen

befreit, indem ein Waschschrift mit Medium-Salz durchgeführt wird. Die Elution der DNA erfolgt schließlich in einem Hoch-Salz-Puffer.

Material

Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen), RNase A (Boehringer), dH₂O, Isopropanol (70 %) (Merck), Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf), Thermoblock 5436 oder 5437 (37 °C) (Eppendorf)

Durchführung

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte aus subkonfluenten „monolayer“-Zellen (5×10^6) mit Hilfe des „Blood & Cell Culture DNA Mini Kit“ von Qiagen. Es wurde genau nach dem Protokoll „Isolation of genomic and plasmid DNA from cell culture using the QIAGEN Genomic-tip“ vorgegangen.

<http://www1.qiagen.com/literature/protocols/pdf/QG04.pdf>

Die genomische DNA diente lediglich als Positivkontrolle zur Überprüfung der RNA-Materialien (siehe 2.20) auf Verunreinigungen durch genomische DNA.

2.20. RNA-Isolierung aus A818-6 und A818-4

Prinzip

Das Prinzip der RNA-Isolierung nach Qiagen basiert auf der Bindung von RNA mit mehr als 200 Nukleotiden an eine Siliciumdioxidmembran. DNA und andere Zellbestandteile werden abgewaschen. Die RNA wird schließlich mit Wasser eluiert.

Material

RNeasy Mini Kit (Qiagen), RNase-Free DNase Set (Qiagen), dH₂O, Beta-Mercaptoethanol (Merck), Ethanol (Merck), Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf)

Durchführung

Für die Isolierung wurden subkonfluente „monolayer“-Zellen eingesetzt. Es wurde nach dem Protokoll für die Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen, vorgegangen. Zusätzlich erfolgte ein DNase Verdau mit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden).

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNASTabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1016272HBRNY_062001WW.pdf

2.21. Reverse Transkription PCR (RT-PCR)

Reverse Transkription

Prinzip

Die isolierte RNA wird bei dieser Methode wieder zur DNA (cDNA) umgeschrieben, die man dann als Ausgangsmaterial für diverse Methoden, wie z.B. PCR einsetzen kann. RNA verfügt über eine

recht ausgeprägte Sekundärstruktur, die zunächst aufgeschlossen werden muss. Dazu erhitzt man die RNA und die Primer auf 65 °C. Damit Primer an die RNA hybridisieren, muss der Ansatz wieder abgekühlt werden. Danach gibt man Puffer, Nukleotide, RNase-Inhibitoren und eine Reverse Transkriptase dazu und inkubiert für 1 h bei 42 °C.

Material

dH₂O, SuperScriptTMII RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen Life Technologies), First-Strand-Buffer (Invitrogen Life Technologies), DTT (Invitrogen Life Technologies), Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen Life Technologies), dNTPs (Invitrogen Life Technologies) total RNA, Thermomixer 5436/5437 (Eppendorf)

Durchführung

Die Reverse Transkription wurde mit SuperScript durchgeführt. Die reverse Transkriptase ist eine etwas modifizierte Form der MMLV-RT ohne intrinsische RNaseH-Aktivität, wodurch längere Transkripte erzielt werden können.

Der Ansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen [µl]
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈	500 µg/ml	0,5 ng/13 µl	1
total RNA	1 µg/µl	5 µg/ 13 µl	5
dNTPs	10 mM	0,5 mM	1
dH ₂ O			6

Der Ansatz wurde zunächst für fünf Minuten bei 65 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Dann folgte die Zugabe der weiteren Komponenten:

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen [µl]
First-Strand Buffer	5X	1X	4
DTT	100 mM	10 mM	2

Es folgte eine Inkubation bei 42 °C für zwei Minuten bevor 1 µl des Enzyms SuperScript (200 U) zupipettiert wurde. Die reverse Transkription wurde für 50 Minuten bei 42 °C durchgeführt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch 15minütiges Erhitzen bei 70 °C. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym, der in der darauffolgenden PCR eingesetzt wurde, um zu überprüfen, dass ein positives Signal nicht infolge einer DNA-Kontamination bzw. durch genomische DNA erzielt wurde. Die Ansätze wurden für die semiquantitative RT-PCR zum Nachweis des pp60c-src-Transkripts eingesetzt.

2.22. Semiquantitative RT-PCR zur Detektion des pp60c-src-Transkripts

Prinzip

Nach der reversen Transkription wurde die cDNA für die PCR-Reaktion eingesetzt. Als Kontrolle und als Anhaltspunkt für die Quantität wurde ein „housekeeping protein“, die GAPDH, mitgeführt.

Material

PCR-Puffer minus Magnesium (Gibco BRL), *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL), Magnesiumchlorid (Gibco BRL), dNTPs (Invitrogen Life Technologies), Vorwärtsprimer (hSrc-for bzw. GAPDH-for), Rückwärtsprimer (hSrc-rev bzw. GAPDH-rev), cDNA (aus 2.21), dH₂O, 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße (Eppendorf), PCR-Cycler (Personalcycler, Biometra).

Durchführung

Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen [µl]
Taq DNA-PCR-Puffer	10X	1X	2
Magnesiumchlorid	50 mM	1,5 mM	0,6
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,4
Vorwärtsprimer	25 µM	0,5 µM	0,4
Rückwärtsprimer	25 µM	0,5 µM	0,4
dH ₂ O			10,2
cDNA	250 ng/µl	250 ng/20 µl	1
auf 80°C im Thermocycler erhitzt, dann Zugabe der Taq-Polymerase			
Taq-Polymerase	0,5 U/µl	2,5 U	5

Als Negativkontrolle wurde der Negativansatz aus der reversen Transkription eingesetzt.

PCR-Programm für pp60c-src:

Denaturierung:	1'94°C
„primer-annealing“	1'61°C
Elongation:	1'72°C
Zyklen	35

PCR-Programm für GAPDH

Denaturierung:	30''94°C
„primer-annealing“	30''62°C
Elongation:	30''72°C
Zyklen	20

Nach der PCR wurden 12 µl der Proben auf einem 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht (siehe 2.8). Eine semiquantitative Beurteilung konnte durch den Vergleich der Banden-Intensitäten für GAPDH durchgeführt werden.

2.23. Standardkultivierung eukaryotischer Zelllinien

Material

RPMI 1640 (Gibco BRL), FCS (Hyclone Labs), L-Glutamin (Gibco BRL), Natriumpyruvat (Gibco BRL), DMEM mit 4500 mg/ml Glucose (Gibco BRL), MEM-non-essential Amino Acids (Gibco BRL), Fibroblast Growth Medium (PromoCell), Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco BRL), PBS (Gibco BRL), CO₂-Water-Jacketed Incubator (Nuaire), Zentrifuge (5804R, Eppendorf), Sterilbank, inverses Mikroskop und Kamera (Axiovert25 und AxioCam MRC, Zeiss), Zellzähler CASY1 (Schärfe Systems GmbH)

Durchführung

A818-6, A818-4	293T	Kif-5-Fibroblasten
RPMI 1640	DMEM	Fibroblast Growth Medium
10 % FCS	10 % FCS	10 % FCS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin	oder Kultivierung wie A818-6
1 mM Natriumpyruvat	1 mM Natriumpyruvat	bzw. A818-4
	MEM-non-essential Amino Acids	

Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (ca. 1 ml/25 cm²) für ca. 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Trypsin/EDTA

wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium inaktiviert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen bei 1400 rpm für vier Minuten sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert. Je nach Dichte wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 gesplittet. Für Versuche, z.B. für die Herstellung von Proteinlysaten, wurden die Zellen grundsätzlich mit Hilfe eines Zellzählers (CASY1) gezählt und in gewünschter Zellzahl ausgesät.

Die morphologische Beurteilung erfolgte mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops. Für die Dokumentation der Ergebnisse diente eine digitale Kamera.

Alle Zelllinien wurden alle drei Monate routinemäßig auf Mycoplasmen-Infektion untersucht.

2.24. Detektion der Mycoplasmen-Infektion mittels „nested PCR“

Prinzip

Bei der „nested PCR“ wird in einer ersten PCR ein Primerpaar eingesetzt, das an hochkonservierte ribosomale Gene (16S und 23S rRNA) hybridisiert. Ein Aliquot aus der ersten PCR wird für eine zweite PCR eingesetzt, in der ein weiteres Primerpaar an speziesspezifische Regionen in diesen ribosomalen Genen bindet.

Material

Zellüberstand (älter als drei Tage), dH₂O, PCR Mycoplasmen Detection Set (TaKaRa), DNA Marker VIII (Boehringer), Igepal (Sigma-Aldrich-Chemie), Tween 20 (Merck), Proteinase K (10 mg/ml) (Boehringer), Tischzentrifuge (5417R, Eppendorf), PCR-Cycler (Personalcycler, Biometra)

Durchführung

Lysis Mix: 0,45 % Igepal, 0,45 % Tween 20

Ein bis zwei Milliliter aus dem Zellüberstand (ca. drei Tage alt) wurden entnommen und für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und das verbleibende Zellpellet in 50 µl dH₂O aufgenommen. Zu den Proben wurden 250 µl Lysis Mix und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) pipettiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Proben bei 56 °C und eine 10minütige Inkubation bei 95 °C. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und für die folgende PCR1 eingesetzt.

PCR1-Ansatz

Komponente	Volumen [µl]
Taq DNA-PCR-Puffer	2
Magnesiumchlorid	0,8
dNTPs	0,5
Vorwärtsprimer F1 (3 µM)	2
Rückwärtsprimer R1 (3 µM)	2
dH ₂ O	14,7
DNA	2,5
Taq-Polymerase	0,5

Parameter PCR 1:

Denaturierung:	1'94°C
„primer-annealing“:	1'63°C, „touchdown“: - 2 °C/Zyklus
Elongation:	1'72°C
Zyklen	4
Denaturierung:	40''94°C
„primer-annealing“:	1'55°C
Elongation:	1'72°C, abschließend 10'72°C
Zyklen	29

2,5 µl des ersten PCR-Ansatzes wurde in eine zweite PCR eingesetzt. Diese wurde wie oben aufgeführt pipettiert. Statt des ersten Primerpaars (F1 und R1) wurde ein zweites Primerpaar (F2 und R2) hinzugefügt. Die PCR-Parameter entsprachen denen der ersten PCR. Der zweite PCR-Ansatz wurde zur Auswertung auf einem 2 %igen Agarosegel (siehe 2.8) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. War eine Bande in Höhe von 180/190-100 bp sichtbar, waren die Zellen mit Mycoplasmen infiziert.

2.25. 3D Kultivierung

Material

Agarose (Invitrogen Life Technologies), dH₂O, entsprechendes Kulturmedium, Zellkulturplatten (Sarstedt), Cell Strainer (40 µm) (BD Falcon), Zentrifuge (5804R, Eppendorf), Inverses Mikroskop und Kamera (Axiovert25 und AxioCam MRc, Zeiss)

Durchführung

3,1 % Agaroselösung wurde autoklaviert und 1:1 mit RPMI 1640 (10 % FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat) gemischt.

Tabelle 1: Volumina der Agarose/RPMI-Beschichtungen sowie ausgesäte Zellzahlen für die verschiedenen Zellkulturplatten.

Zellkulturplatte	Agarose/RPMI (1:1)	Zellzahl
10 cm	10 ml	1,5 - 2 x 10 ⁶ /10 ml
6-Kammerplatte	2 ml/Kammer	3 - 5 x 10 ⁵ /2 ml
12-Kammerplatte	1 ml/Kammer	1,5 x 10 ⁵ /ml
96-Kammerplatte	0,1 ml/Kammer	1 - 4 x 10 ³ /0,1 ml

Ein Mediumwechsel wurde nach drei Tagen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bei 700 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. A818-6 „hollow spheres“ wurden nach fünf Tagen auf unbeschichtete Zellkulturplatten überführt, da reife „hollow spheres“ nicht mehr adhärieren, wurden auf diese Weise reife von unreifen „hollow spheres“ gereinigt. Zur Herstellung von Proteinlysaten oder zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Sphäroiden oder „hollow spheres“ wurden diese mit Hilfe eines Filters mit 40 µm Poren (Cell Strainer von BD Falcon) von Einzelzellen und kleineren Zellaggregaten befreit.

Die morphologische Beurteilung erfolgte mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops. Für die Dokumentation der Ergebnisse diente eine digitale Kamera.

Die Serienaufnahmen der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung wurden von der Arbeitsgruppe des Herrn Dr. Knippschild in Ulm durchgeführt. Dazu wurden 3,5 cm große Coverslips mit der oben aufgeführten Agaroselösung beschichtet und in eine 5 cm Kulturschale überführt. Anschließend wurden 400000 Zellen/4 ml Medium in die Kulturschale gegeben. Die Kulturschale mit den Zellen wurde in eine beheizbare Kammer eingebaut und für mehrere Tage mit Hilfe eines Videomikroskops beobachtet.

2.26. Kokultivierung

Kokultivierung in 3D-Kultur

Durchführung

Für die Kokultivierung wurden unterschiedlich transduzierte Zellen und/oder verschiedene Zelllinien in einem äquivalenten Verhältnis gemischt. Die eingesetzte Gesamtzellzahl war entsprechend der verwendeten Zellkulturplatten (**Tabelle 1**). Einerseits wurden die verschieden transduzierten Tumorzellen untereinander in allen Kombinationen kokultiviert. Andererseits wurden auch die mit

Epmorphin-DNA transduzierten A818-4 und A818-6-Zellen entweder mit EGFP-transduzierten A818-6-Zellen oder mit EGFP-transduzierten Kif5-Fibroblasten gemischt und auf Agarose-Platten ausgesät.

Kokultivierung von Sphäroiden auf adhärennten Kif-5Fibroblasten

Durchführung

Transduzierte A818-4-Zellen wurden für drei Tage unter 3D-Kulturbedingungen gehalten. Die Sphäroide wurden schließlich herausgefiltert, auf konfluente Kif-5-Fibroblasten und zur Kontrolle auf einen konfluenten A818-4 „monolayer“ ausgesät. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen lichtmikroskopisch begutachtet.

Kokultivierung von transduzierten A818-4-Zellen mit A818-6 „monolayer“- und „hollow sphere“-Zellen in Transwells

Durchführung

6-Kammerplatten wurden mit einem Volumen an Agarose/RPMI-Lösung beschichtet, das gerade die Oberfläche bedeckte. Auf die Platten wurden 3×10^5 A818-4-Zellen ausgesät. In die Kammern wurden COSTAR-Transwells (Costar) mit einer Porengröße von $12 \mu\text{m}$ gehängt, in denen sich entweder A818-6 „monolayer“-Zellen, A818-6 „hollow spheres“ oder zur Kontrolle A818-4 „monolayer“-Zellen befanden. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet.

2.27. Inhibitorbehandlung der Zellen

Material

Inhibitoren (siehe 2.6), Lösungsmittel: DMSO (Merck), Methanol (Carl Roth GmbH), Ethanol (Merck), dH_2O .

Durchführung

Die Inhibitoren wurden in entsprechenden Konzentrationen, die dem Ergebnisteil zu entnehmen sind, entweder direkt nach Aussaat der Zellen oder auf bereits ausgebildete „hollow sphere“-Strukturen bzw. adhärennte Zellen gegeben. Als Kontrollansatz diente jeweils die entsprechende Konzentration des Lösungsmittels.

2.28. Lipofektion von 293T Zellen zur Herstellung retroviraler Überstände

Prinzip

Die Lipofektion wurde mit dem Lipofektamin 2000 von Invitrogen Life Technologies durchgeführt. Das Reagenz enthält eine liposomenbildende Substanz, die aufgrund ihrer positiven Ladung mit der zu transfizierenden Nukleinsäure komplexiert. Dieser Komplex gelangt in die Zelle, indem er mit der Zelloberfläche fusioniert und so aufgenommen wird.

Material

293T-Zellen als Verpackungszelllinie (ATCC, CRL 1575), Kulturmedium, Optimem-Medium (Gibco BRL), Vektor pkat gagpol/ATG, Vektor pCMV-VSV-G, Vektor mit Gen von Interesse (plxin, plxinEpiI, plxinEpiII, plxinEpiIII), Lipofectamin2000 (Invitrogen Life Technologies), 10 cm Primaria-Platten (BD Falcon), Polypropylen-Röhrchen (BD Falcon), 10 ml-Spritze (Becton Dickinson GmbH), 0,45 µm Filter (AcroDisc).

Durchführung

Für die Durchführung war eine S2-Genehmigung erforderlich.

Die „Verpackungs-Zelllinie“ 293T wurde 24 h vor Lipofektion in einer Dichte von 4×10^6 auf 10 cm Primaria-Platten ausgesät. Drei bis vier Stunden vor der Lipofektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Zur Lipofektion wurden zwei Plasmide (pkat gagpolATG und pCMV-VSV-G), deren Sequenzen für die Enzyme und Verpackungsproteine der Retroviren codieren, gemeinsam mit dem Plasmid mit der klonierten DNA in die Zellen kotransfiziert.

Ansatz der Lipofektion:

Ansatz 1:

Optimem-Medium	900 µl
pkat gagpol/ATG	6,5 µg
Plasmid mit Gen von Interesse	10 µg
pCMV-VSV-G	3,5 µg

Ansatz 1 gut mit der Pipette vermischt

Ansatz 2:

Optimem-Medium	900 µl
Lipofectamin2000	60 µl

Ansatz 2 wurde gut gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze zusammenpipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Inkubationszeit wurden 1,8 ml der Lösung auf die 293T Zellen gegeben und vorsichtig vermischt. 18 h – 24 h nach der Lipofektion wurde wieder ein Mediumwechsel vorgenommen und für weitere 24 h auf den Zellen gelassen. Danach wurde der Überstand, der die Retroviren enthielt, mit der 10 ml-Spritze von den Zellen abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter von Zellrückständen befreit. Entweder wurden direkt 1-2 ml Überstand auf die zu transduzierenden Zielzellen gegeben oder er wurde zur längeren Aufbewahrung bei -80°C eingefroren.

2.29. Transduktion adhärenter Zellen

Material

Zielzellen (A818-4 und A818-6), Kulturmedium, G418 (PromoCell), Polybren (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Überstand mit den entsprechenden Retroviren (siehe 2.28).

Durchführung

Für die Durchführung war eine S2-Genehmigung erforderlich.

2×10^5 der Zielzellen wurden auf 6-Kammerplatten mit 20 µg/ml Polybren 24 h vor der Transduktion ausgesät. Für die Transduktion wurde das Medium abgenommen und durch 1 bis höchstens 2 ml des vorher erzeugten Virusüberstands ersetzt. Dieser blieb für 24 h auf den Zielzellen. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Kulturmedium und G418 (A818-4: 700 µg/ml; A818-6: 1 mg/ml) zur Selektion auf die Zellen gegeben. Für die stabile Transduktion wurden die Zellen solange unter Selektionsdruck gehalten bis alle Wildtypzellen, die zur Kontrolle mitgeführt wurden, gestorben waren.

Mehrfach-Transduktion:

Dazu wurden die entsprechenden Überstände mit den verschiedenen Retroviren zu gleichen Teilen gemischt und auf die Zielzellen gegeben. Die weiterführende Prozedur entsprach der bereits beschriebenen.

2.30. Herstellung konditionierter Medien

Material

Entsprechende Zelllinien, Kulturmedium, Zentrifuge (5804R, Eppendorf),

Durchführung

1. Das Medium von 3D-kultivierten A818-6-Zellen wurde nach 24 h, 48 h und 72 h nach initialer Aussaat entnommen und durch Zentrifugation von Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand wurde auf A818-4-Zellen, die synchron zu den A818-6-Zellen unter 3D-Bedingungen gehalten wurden, gegeben. Dazu wurde die Hälfte des Mediums von A818-4 mit dem Überstand von den A818-6-Zellen ausgetauscht.
2. FCS-freies Medium wurde für unterschiedliche Zeiten mit Epimorphin-transduzierten A818-6-Zellen inkubiert. Der Überstand wurde dann bei 14000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert um Zellbestandteile aus dem Medium zu entfernen. Die konditionierten Überstände wurden auf A818-6-Wildtypzellen gegeben, mit denen dann nach unterschiedlichen Inkubationszeiten ein Viabilitätsassay (2.41) durchgeführt wurde.

2.31. Herstellung von Proteinlysaten

Material

dH₂O, Tris-Base (Carl Roth GmbH), NaCl (Carl Roth GmbH), EDTA (Merck), DTT (Merck), NP40 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Natrium-Deoxycholate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), SDS (Merck), Natriumorthovanadat (Promega), Natriumfluorid (Merck), Proteininhibitor-Tablette (Boehringer), kaltes PBS (Gibco BRL), Zellschaber (BD Falcon), Cell Strainer (40 µm) (BD Falcon), 26G ½ Kanülen (Becton Dickinson GmbH), 1 ml Spritzen (Becton Dickinson GmbH), Zentrifuge (5804R, Eppendorf), Tischzentrifuge (5417R, Eppendorf).

Durchführung

RIPA-Puffer: 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 % (v/v) NP40, 0,5 % Natrium-Deoxycholate, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM Natriumfluorid, 1 Tablette Complete-Proteininhibitor pro 50 ml

Bei -20 °C gelagert.

Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und anschließend in einem geeigneten Volumen RIPA-Puffer (z.B. 3 ml/T75-Flasche) aufgenommen. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen abgekratzt und in neue Reaktionsgefäße überführt. Zum Scheren der DNA wurde das Gesamtzell-Lysat mindestens sechsmal durch eine Kanüle gezogen. Zelldebris wurden für 10 Minuten in der Tischzentrifuge bei 14000 rpm (4 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Proteinbestimmung eingesetzt.

Zur Lysatherstellung aus „hollow spheres“ oder Sphäroiden wurden diese von Einzelzellen und kleinen Zellaggregaten durch Filtration (Cell Strainer, Porengröße 40 µm) befreit und einmal mit 5 bis 10 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert (4 Minuten bei 1400 rpm in der Zentrifuge 5804R). Im Weiteren wurde vorgegangen, wie bereits für den „monolayer“ beschrieben

Lysate zur Detektion der sauren Ceramidase und pp60c-src

Material

dH₂O, Tris-Base (Carl Roth GmbH), HCl (Carl Roth GmbH), Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), SDS (Merck), DTT (Merck), Bromphenolblau (Merck), Zellschaber (BD Falcon), G26 ½ Kanülen (Becton Dickinson GmbH), 1 ml Spritzen (Becton Dickinson GmbH)

4X Lämmli-Puffer: 0,62 g DTT, 0,4 g SDS, 6 ml Glycerol, 2ml 1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,2 mg Bromphenolblau ad 10 ml dH₂O

Die Zellen wurden dazu direkt in einem geeigneten Volumen 2 x Lämmli-Puffer lysiert (z.B. 200 µl 2 x Lämmli auf einer subkonfluenten 6-Kammerplatte). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt. Zum Scheren der DNA wurde das Lysat mindestens sechsmal durch eine Kanüle gezogen. Die Proben wurden anschließend für die SDS-PAGE (siehe 2.35) eingesetzt.

2.32. Immunpräzipitation von pp60c-src

Material

dH₂O, Tris-Base (Carl Roth GmbH), HCl (Carl Roth GmbH), NaCl (Carl Roth GmbH), NP-40 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), SDS (Merck), EDTA (Merck), Natriumorthovanadat (Promega), Natriumfluorid (Merck), Proteinaseinhibitor-Tablette (Boehringer), Agarose-konjugierter Anti-Src (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), kaltes PBS (Gibco BRL), Zellschaber (BD Falcon), G26 ½ Kanülen (Becton Dickinson GmbH), 1 ml Spritzen (Becton Dickinson GmbH), Tischzentrifuge (5417R, Eppendorf), Thermomixer (5436, Eppendorf), Kapillarpipettenspitzen (Biozym).

Durchführung

2X Lysispuffer: 100 mM Tris (pH 7,4), 300 mM NaCl, 2 % (v/v) NP-40, 0,5 % (w/v) SDS, 10 mM EDTA, 2 mM Natriumorthovanadat, 2 mM Natriumfluorid, 1 Tablette Complete-Proteinaseinhibitor für 25 ml Lysat

1 x 10⁶ Zellen wurden auf eine T75-Flasche ausgesät und nach 48 h Kultivierung für die Lysatherstellung eingesetzt. Pro T75-Flasche wurden 3 ml 2X Lysispuffer gegeben und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden abgekratzt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zelldebris wurden für 15 Minuten bei 14000 rpm, 4 °C, abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt. Für die Immunpräzipitation wurden 500 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Volumina wurden auf 1,5 ml mit kaltem PBS eingestellt. Die Lysate wurden zu einem Agarose-konjugierten Anti-src –Antikörper pipettiert. Zwischen den Waschschritten wurde das Konjugat für fünf Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Lysat und Antikörper-Konjugat wurden für 1 h oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten fünf Waschschrritte mit kaltem PBS. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet in 90 µl 2 x Lämmli-Puffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden schließlich in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Membran geblottet.

2.33. Ko-Immunpräzipitation von pp60c-src

Material

dH₂O, Tris-Base (Carl Roth GmbH), HCl (Carl Roth GmbH), NaCl (Carl Roth GmbH), NP-40 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), MgCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Triton X-100 (Boehringer), Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), DTT (Merck), EDTA (Merck), Natriumorthovanadat (Promega), Natriumfluorid (Merck), Proteinaseinhibitor-Tablette (Boehringer), kaltes PBS (Gibco BRL), Zellschaber (BD Falcon), G26 ½ Kanülen (Becton Dickinson GmbH), 1 ml Spritzen (Becton Dickinson GmbH), Tischzentrifuge (5417R, Eppendorf), Thermomixer (5436, Eppendorf), Kapillarpipettenspitzen (Biozym)

Durchführung

.....

Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 % (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (v/v) NP-40, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Natriumorthovanadat, 50 mM Natriumfluorid

.....

Vorgehensweise siehe Immunpräzipitation (2.32).

2.34. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Material

BCA-Reagenz A und B (Pierce), dH₂O, BSA-Standard (2 mg/ml) (Pierce), entsprechender Lysispuffer, 96-Kammer-Flachboden-Platten, Brutschrank (Heraeus), Plattenphotometer (Sunrise, Tecan Deutschland GmbH)

Durchführung

Die Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode von Pierce bestimmt. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe mit einem BSA-Standard, Ausgangskonzentration 2 mg/ml, angesetzt. Die Proben wurden in der Regel vor der Konzentrationsbestimmung 1:10 in Lysispuffer verdünnt. Für die Standardkurve wurde Dreifach- und für die Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Leerwert wurde das Verdünnungsmittel (Lysispuffer) eingesetzt. Alle Proben wurden 1:10 mit dem BCA-Reagenz, bestehend aus Reagenz A und B (50:1), verdünnt und für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Die Messung erfolgte im Plattenphotometer

2.35. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip

SDS ist ein Detergenz, das Proteine bindet und diese denaturiert. Dadurch entstehen negativ geladene Komplexe, die sich lediglich noch durch ihre Masse unterscheiden. Im elektrischen Feld wandern die Komplexe zur Anode und werden dabei in der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Material

Tris-Base (Carl Roth GmbH), HCl (Carl Roth GmbH), dH₂O, Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 % w/v) (Carl Roth GmbH), SDS (Merck), Ammoniumpersulfat (Merck), TEMED (Serva), DTT (Merck), Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Bromphenolblau (Merck), Glycin (Carl Roth GmbH), Butanol (Carl Roth GmbH), Benchmark (Invitrogen Life Technologies), Thermomixer (5436, Eppendorf), Kapillarpipettenspitzen (Biozym), Elektrophoresekammer (Fertiggelkammer, Invitrogen Life Technologies oder PA Verticalelektrophoresekammer, Biorad), Spannungsgerät (Standard Power Pack P25, Biometra)

Durchführung

Sammelgelpuffer: 500 mM Tris-HCl (pH 6,8)

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (pH 8,8)

Trenngel (15 %): 2,4 ml dH₂O, 2,5 ml Trenngelpuffer, 50 µl 10 % (w/v) SDS, 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 50 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED

Sammelgel (5 %): 3,075 ml dH₂O, 1,25 ml Sammelgelpuffer, 50 µl 10 % (w/v) SDS, 0,6 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 25 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED

4X Lämmli-Puffer: 0,62 g DTT, 0,4 g SDS, 6 ml Glycerol, 2ml 1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,2 mg Bromphenolblau ad 10 ml dH₂O

Laufpuffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

Es wurde die diskontinuierliche Elektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein Trenngel gegossen. Die Oberfläche wurde zwecks gleichmäßiger Polymerisation an der Grenzfläche mit Butanol überschichtet, das nach dem Aushärten des Trenngels wieder abgegossen wurde. Dann folgte die Überschichtung mit dem Sammelgel, in das ein Kamm mit 10 Taschen gesteckt wurde.

Alternativ wurden auch Gradientengele (4-20 %) von den Firmen Invitrogen Life Technologies und Anamed verwendet.

Die Proteinlysate wurden entweder in 4 x Lämmli-Puffer verdünnt oder direkt in 2 x Lämmli (siehe z.B. IP 2.32) aufgenommen. Vor dem Auftragen wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C

erhitzt. Maximal 35 µl wurden in die Taschen des Gels pipettiert, wozu Kapillarpipettenspitzen verwendet wurden. Zusätzlich wurde pro Gel eine Tasche mit 10 µl MG-Marker „Benchmark“ bestückt. Die Elektrophorese wurde mit 60 V gestartet. Die Trennung erfolgte dann bei 100 V. Gradientengele liefen durchgehend bei 130 V.

2.36. Westernblot

Material

Methanol (Carl Roth GmbH), dH₂O, Tris-Base (Carl Roth GmbH), Glycin (Carl Roth GmbH), Blotkammer (Bio-Rad), Filterpapier, PVDF-Membran (Millipore Corporation), Schwämme, PA-Gel aus der PAGE (2.35), Spannungsgerät (Standard Power Pack P25, Biometra)

Durchführung

Blotpuffer: 25 mM Tris (pH 8,1 – 8,4), 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

Bei 4 °C aufbewahren.

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert. Dazu wurde eine 6 x 9 cm große Membran für kurze Zeit mit Methanol überschichtet und anschließend in H₂O gewaschen. Die Blotkassette wurde in Blot-Puffer bestückt. Zunächst wurde ein Schwamm mit zwei Schichten Filterpapier platziert, auf dem dann das Gel und die Membran ausgerichtet wurden. Es folgten weitere zwei Schichten Filterpapier und ein Schwamm. Das Ganze wurde möglichst luftblasenfrei verschlossen und so in die Blotkammer eingesetzt, dass die Membran in Richtung der Anode lag.

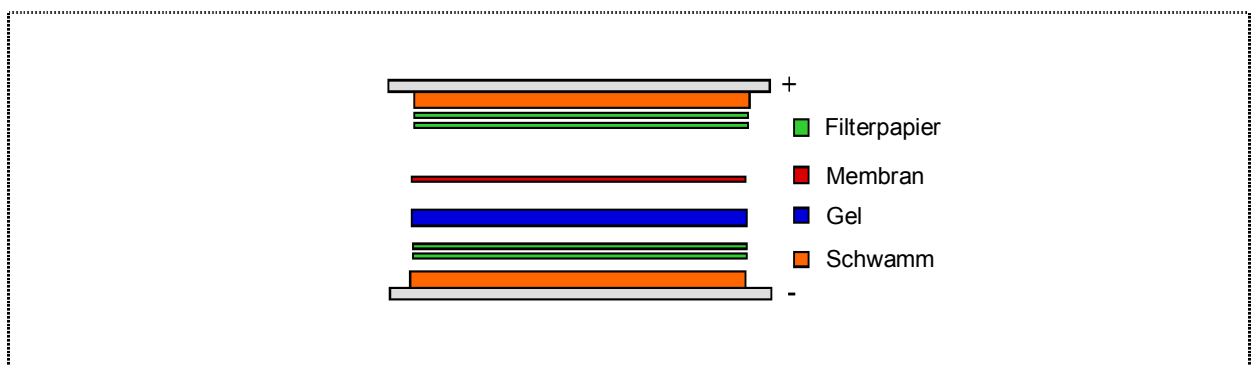


Abbildung 7: Bestückung der Blotkassette

Nach 1 - 1,5 h bei 400 mA wurde der Transfer beendet.

Detektion

Material

Tris-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), NaCl (Carl Roth GmbH), KCl (Merck), Tween-20 (Merck), Magermilchpulver (Merck), Primärantikörper (siehe 2.5), Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (Amersham Biosciences), Entwickler (AGFA), Fixierer (AGFA), H₂O, ECL oder ECLplus (Amersham Biosciences), Filme (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences), Entwickler Curix60 (AGFA)

Durchführung

TBS-T: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1 % (v/v) Tween-20

Blockierungspuffer: 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

Die Membran wurde nach dem Westernblot für entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht in Blockierungspuffer geschwenkt, um alle unbesetzten Bindungsstellen abzusättigen. Der Nachweis des gewünschten Proteins erfolgte mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers, der in der Regel nach Herstellerangaben in Blockierungspuffer verdünnt wurde. Die Inkubation mit dem Primärantikörper verlief meist über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für je fünf Minuten wurde mit einem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen die Spezies, aus dem der Primärantikörper stammte, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden wieder durch Waschen mit TBS-T entfernt (3 x je 5 min). Mittels des ECL-Systems konnten die Immunbindungen auf einem Film nachgewiesen werden. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Hilfe eines automatisierten Verfahrens.

Entfernung von Antikörperkomplexen zur Wiederverwendung der Membran („strippen“):

Material

Beta-Mercaptoethanol (Merck), Tris-Base (Carl Roth GmbH), HCl (Carl Roth GmbH), SDS (Merck), Wasserbad (Heraeus)

Durchführung

Strippuffer:

50 mM Tris (pH 6,8), 100 mM Beta-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS

Die zu „strippende“ Membran wurde mit 25 ml Strippuffer in einer Pipettenbox luftdicht verschlossen und für 20 Minuten bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal kurz und zweimal für 10 Minuten mit TBS gewaschen. Die Membran wurde für eine erneute Detektion nochmals in Blockierungspuffer inkubiert.

2.37. TRAP-Assay

Prinzip

Bei dieser Methode wird die Telomeraseaktivität in einem Zelllysats bestimmt, indem man die Fähigkeit in einem *in-vitro*-System nach Zugabe entsprechender Primer und dNTPs, telomerische Sequenzwiederholungen an ein Substratoligonukleotid zu synthetisieren, untersucht. Die resultierenden verlängerten Sequenzen werden in einer PCR amplifiziert und anschließend in der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Die Mitführung eines internen Standards (ITAS) ermöglicht die quantitative Analyse der Telomeraseaktivität.

Lysatherstellung:

Material

RNase-freies dH₂O, CHAPS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Tris-HCl (pH 7,5) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), MgCl₂ (Merck), EGTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Beta-Mercaptoethanol (Merck), AEBSF (MP Biomedicals, Inc.), RNasin (Promega), PBS (Gibco BRL), N₂, Tischzentrifuge (5417R, Eppendorf), Zellschaber (BD Falcon)

Durchführung

Lysispuffer: 0,5 % (w/v) CHAPS, 10 % (v/v) Glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM Beta-Mercaptoethanol

Aufbewahrung bei 4 °C.

Direkt vor Lysatherstellung erfolgte die Zugabe von:

1 bis 2 mM AEBSF und 1 µl/µl RNasin

Zur Lysatherstellung wurden die Zellen 24 h vorher in einer Zelldichte von 3 x 10⁵ pro Kammer in 6-Kammerplatten ausgesät. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, und anschließend wurde direkt auf die Zellen 100 µl Lysispuffer gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und kurz in N₂ gehalten um den Zellaufschluss zu verbessern. Darauffolgend wurden die Proben auf Eis wieder aufgetaut. Die Zelldebris wurden mittels Zentrifugation, 30 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C, pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Proteinbestimmung (siehe 2.34) eingesetzt.

TRAP-Assay:

Der TRAP-Assay wurde freundlicherweise von Dr. W. Klapper, Pathologie in Kiel, wie schon zuvor beschrieben (Klapper et al., 1998); (Krupp et al., 1997) durchgeführt.

Material

Lysate, RNase-freies dH₂O, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, dNTPs (Invitrogen Life Technologies), Tris-HCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), EGTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Tween 20 (Merck), MgCl₂ (Merck), KCl (Merck), ITAS (Dr. W. Klapper, Pathologie, Kiel), Taq Polymerase

(Invitrogen Life Technologies), PCR-Cycler (Personalcycler, Biometra), Kapillarelektrophorese-Apparatur (ABI Prism 310, PerkinElmer)

Durchführung

10 x TRAP-Reaktionspuffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EGTA, 0,05 % (v/v) Tween 20, 15 mM MgCl₂, 630 mM KCl

Die PCR wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen [μl]
TRAP-Puffer	10x	1X	5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1
ITAS	0,5 amol	0,001 amol	0,1
TS	10 pmol/μl	10 pmol	1
CText	10 pmol/μl	10 pmol	1
dH ₂ O			39,6
Taq-Polymerase	5 U/μl	1,5 U	0,3
Lysat	0,015-1,5 μg/μl	0,03-3 μg	2

PCR-Programm:

Telomerasereaktion	30'30°C
Denaturierung	60''94°C
Denaturierung:	30''94°C
„primer-annealing“:	30''50°C
Elongation:	30''72°C, abschließend 10'72°C
Zyklen	34

Jeweils 2 μl des Ansatzes wurden in der Kapillarelektrophorese aufgetrennt.

Die Telomeraseprodukte, die fünf bis zu 16 telomerische Hexamer-Sequenzwiederholungen aufwiesen, wurden addiert und durch den Wert des internen Standards (ITAS) dividiert. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe aus Extrakten von HL60-Zellen gemessen und ausgewertet. Mit Hilfe dieser Werte wurde eine Eichkurve erstellt (GraphPad Prism für Windows). Anhand dieser Eichkurve konnte die relative Telomeraseaktivität der zu untersuchenden Probe ermittelt werden.

2.38. Immunzytochemie

Material

PBS (Gibco BRL), Natriumazid (Merck), eiskaltes Methanol (Carl Roth GmbH), TBS, TBS-T, Glycin (Merck), BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Primär-Antikörper (siehe 2.5), Sekundär-Antikörper, Höchst-Farbstoff (Boehringer), autoklavierte, runde Deckgläser, 12-Kammerplatten (Nunc), Cell Strainer (40 µm, BD Falcon), Objektträger mit Vertiefung, Slowfade light (Molecular Probes) Nagellack, 37°C-Brutschrank, Fluoreszenzmikroskop mit Kamera (Axioskop 40 und Axiocam MRc, Zeiss) oder „laser scanning microscop“ LSM510 (Zeiss), LSM 5 Image Browser (Zeiss)

Durchführung der Färbung von „monolayer“-Zellen

PBS/Azid: 0,1 % (w/v) Azid in PBS

TBS: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl

TBS-T: 0,05 % (v/v) Tween in TBS

Blockierungspuffer: 0,1 % (w/v) BSA, 0,2 % (w/v) Glycin in TBS

Primärantikörper-Lsg: Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben in Blockierungspuffer verdünnt.

Sekundärantikörper-Lsg.: Sekundärantikörper wurde nach Herstellerangaben in TBS verdünnt. Zur Kernfärbung wurde zusätzlich Höchst-Farbstoff in einer Verdünnung von 1:1000 zugefügt.

Die Zellen wurden 48 h vor der Färbung direkt auf autoklavierte, runde Deckgläser, die in 12-Kammerplatten gelegt wurden, ausgesät. Vor der Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS/Azid gewaschen und dann mit 100 %igem, eiskaltem Methanol für 10 Minuten bei -20 °C fixiert und permeabilisiert. Es folgten zwei Waschschrte mit TBS und eine anschließende einstündige Blockierung in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein wurde entweder nach Herstellerangaben oder, wenn nichts anderes angegeben war, 1:100 in Blockierungspuffer verdünnt. Für die Inkubation wurden die Deckgläser mit den adhärenen Zellen vorsichtig aus den 12-Kammerplatten entnommen und mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen (50 µl) Primärantikörper-Lösung, der zuvor auf Parafilm in einer feuchten Kammer plaziert wurde, luftblasenfrei gelegt. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Deckgläser zum Waschen wieder in 12-Kammerplatten überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Oberfläche mit den Zellen nach oben zeigte. Der Waschvorgang bestand aus folgenden Schritten:

Für die Sekundärantikörper-Inkubation wurde der mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper 1:100 in TBS oder nach Herstellerangaben verdünnt. Zur Kernfärbung diente der Hoechstfarbstoff, der 1:1000 in der Sekundärantikörper-Lösung verdünnt wurde. Wieder wurden für

die Inkubation die Deckgläser auf 50 µl Antikörper-Lösung gelegt und in einer feuchten Kammer bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Es folgte daraufhin ein weiterer Waschvorgang wie bereits oben beschrieben. Zum Eindeckeln wurden die Deckgläser schließlich auf Objektträger mit Slowfade light gelegt und mit Nagellack abgedichtet.

Die Begutachtung fand entweder mit einem Axioskop2-Fluoreszenzmikroskop oder für die konfokale Mikroskopie mit einem Laserscanning Mikroskop LSM510UV von Zeiss statt. Die Weiterverarbeitung der Bilder am PC erfolgte mit Hilfe der Software LSM 5 Image Browser.

Durchführung der Färbung von Sphäroiden und „hollow spheres“

Das Färbeprotokoll entsprach dem der „monolayer“-Zellen. Zum Waschen wurden die Zellen auf Filter mit einer Porengröße von 40 µm (BD Falcon) gegeben. Die Antikörper-Inkubation wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Antikörper-Lösung durchgeführt. Die Zellen wurden in Slowfade light auf speziellen Objektträgern mit Vertiefung eingedeckelt und mit Nagellack abgedichtet.

Die Mikroskopie am LSM wurde freundlicherweise von Frau Dr. M.L. Kruse, 1. Med. Klinik (Kiel), durchgeführt.

2.39. Färbungen für die Durchflusszytometrie

Material

PBS (Gibco BRL), EDTA (Merck), Methanol (Merck), FACS-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH), Zentrifuge (5804R, Eppendorf), Durchflusszytometer (FacsScan, Becton Dickinson GmbH), CELLQuest (BD Bioscience), WinMDI (Version 2.8#13, Joe Trotter, Scripps Institute)

PBS/EDTA: 5 mM EDTA in PBS

PBS/Azid: 0,05 % Azid in PBS

Antikörperlösung: entsprechender AK in PBS mit 1 % BSA nach Herstellerangaben verdünnt

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden adhärenente Zellen mit PBS/EDTA abgelöst und anschließend im Medium durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden in eiskaltem Methanol für 30 Minuten bei -20°C fixiert und permeabilisiert, dieser Vorgang wurde ausgelassen, wenn es sich lediglich um Zelloberflächenfärbungen handelte (Bsp.: Epimorphin, CD95). Anschließend wurde der Alkohol wieder entfernt (Zentrifugationsschritte zum Pelletieren der Zellen immer bei 4 °C, 1500 rpm) und die Zellen einmal mit kaltem PBS/Azid gewaschen. Darauf folgte die Färbung mit einem Primärantikörper für eine Stunde auf Eis. War dieser direkt fluoreszenzgekoppelt (Bsp.: M30-FITC), erfolgte direkt nach der Primärantikörper-Inkubation ein zweimaliges Waschen mit kaltem PBS und die anschließende Messung. War der Primärantikörper ungekoppelt, so schloss sich an die Primärantikörper-Inkubation und dem darauffolgendem Waschschrift eine Sekundärantikörper-

inkubation (30 – 60 Minuten bei 4 °C, lichtgeschützt). Nach der Inkubation mit einem entsprechenden Sekundärantikörper wurden die Zellen abermals zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Proben wurden während der gesamten Prozedur auf Eis gehalten. Die Fluoreszenzmessung der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer mit dem entsprechenden Kanal. Die Auswertung wurde mit der Software CellQuest. und WinMDI Ver 2.8. durchgeführt

Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Färbung:

Prinzip

Propidiumjodid ist ein basischer, fluoreszierender Farbstoff, der in den Zellkern eindringt und in die DNA-Doppelhelix interkaliert.

Material

PBS (Gibco BRL), EDTA (Merck), Ethanol (Merck), RNase A (Boehringer), Propidiumjodid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), FACS-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH), Zentrifuge (5804R, Eppendorf), Durchflusszytometer, CELLQuest (BD Bioscience), WinMDI (Version 2.8#13, Joe Trotter, Scripps Institute)

Durchführung

PBS/EDTA: 5 mM EDTA in PBS

Propidiumjodidlösung: 100 µg/ml Propidiumjodidlösung in PBS

Für die Färbung wurden sowohl die adhärenenten als auch die bereits abgelösten Zellen eingesetzt. Um die bereits abgelösten Zellen zu färben, wurde der Mediumüberstand abgenommen und später mit den durch EDTA abgelösten Zellen gepoolt. Die adhärenenten Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS/EDTA bei 37 °C abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde 1 ml Ethanol (-20 °C) langsam zugegeben und gleichzeitig gemischt. Die Fixierung wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Alkohol nach der Zentrifugation und zweimaligem Waschen entfernt. Die Zellen wurden wieder in PBS aufgenommen und mit RNase A (20 µg/0,5 ml) für 30 Minuten bei 37 °C behandelt. Nach Abzentrifugation der Zellen, wurde das Pellet in 0,5 ml Propidiumjodidlösung aufgenommen und für ca. 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Dazu wurden standardmäßig ein Dotplot mit FSC/SSC (Zellgröße/Granularität) und ein Dotplot mit FL-2A versus FL-2W gewählt. DDM⁵ wurde aktiviert. Die Datenaufnahme erfolgte an einem Macintosh Rechner mit dem Programm CELLQuest und die Weiterverarbeitung am PC mit der Software WinMDI Ver 2.8.

⁵ „doublet discrimination mode“

2.40. Herstellung der Zellüberstände zum Nachweis des extrazellulären Epimorphin

Material

6-Kammerplatten (Nunc), entsprechendes Kultrmedium (siehe 2.23) mit und ohne 10 % FCS, PBS (Gibco BRL), CO₂-Water-Jacketed Incubator (Nuaire), Tischzentrifuge (5417R, Eppendorf), Sterilbank, Zellzähler CASY1 (Schärfe Systems GmbH)

Durchführung

3×10^5 Zellen wurden pro Kammer in 6-Kammerplatten ausgesät und zunächst über Nacht in Anwesenheit von 10 % FCS inkubiert. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das FCS-haltige Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS von FCS-Rückständen befreit. Anschließend wurde 1 ml FCS-freies Medium auf die Zellen gegeben und für weitere 48 h inkubiert. Die Überstände wurden entnommen und bei 14000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um Zellbestandteile zu entfernen. Die Überstände wurden für die Detektion von Epimorphin (2.40.1) eingesetzt.

2.40.1. Detektion von Epimorphin im Zellüberstand

Material

Zellüberstände (2.40), Centricon YM-3 (Millipore), Zentrifuge (Biofugestratos, Heraeus)

Durchführung

Der von Zelldebris befreite Zellüberstand wurde über eine Centricon-Säule, die Moleküle von unter 3 kDa herausfiltert, aufkonzentriert. Dazu wurde der Überstand auf der Säule bei 5000 g (4 °C) so lange zentrifugiert bis fast das gesamte Medium durch die Säule gelaufen war. Anschließend wurde die Säule umgedreht, 50 µl PBS zugegeben und nochmals für 2 Minuten bei 300 bis 1000 g zentrifugiert (4 °C). 30 µl der Probe wurde abgenommen und mit 10 µl 4 x Lämmli versetzt. Anschließend wurde weiter verfahren wie bereits für die SDS-PAGE beschrieben (2.35).

2.41. Viabilitätsassay

Prinzip

Hierzu wurde der kommerziell erhältlich EZ4U-Assay von Biomedica verwendet. Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit aktiver Mitochondrien, Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umzufärben.

Material

EZ4U enthält Substrat und Aktivatorlösung (Biomedica), Zellen auf 96-Kammerplatten (Nunc), Plattenphotometer (Sunrise, TECAN)

Durchführung

Für den Test wurden $1 \times$ oder 3×10^3 Zellen pro Kammer einer 96-Kammerplatte ausgesät. Es wurde eine 8 bis 12fach-Bestimmung durchgeführt.

Vor Beginn wurde das Substrat in 2,5 ml Aktivatorlösung aufgelöst und bei 37 °C vorgewärmt. Pro Kammer wurden 20 µl des Substrats zu 200 µl Zellkulturmedium pipettiert. Die Zellen wurden dann nach entsprechender Inkubationszeit (2-5 Stunden) für den Viabilitätsassay eingesetzt.

Die Messung erfolgte in einem Plattenphotometer bei einer Absorptionswellenlänge von 450 nm.

2.42. 3H-Thymidin-Inkorporationsmethode

Prinzip

Zur Quantifizierung des Zellwachstums kann die Rate der DNA-Neusynthese gemessen werden. Dazu werden Tritium-markierte Nukleotide zum Testansatz gegeben und die Strahlung der letztendlich entstandenen Zellen im Szintillationszähler bestimmt. Dazu wurden Zellen mit 3H-Thymidin metabolisch markiert. Gemessen wird die in die DNA-eingebaute Radioaktivität, die dem Wachstum der Zellen proportional ist.

Material

3H-Thymidin (Amersham Biosciences), Kulturmedium (2.23), Trypsin/EDTA (Gibco BRL), dH₂O, Betaplast Scint Wallac (Wallac), 96-Kammerplatten (Nunc), printed Filtermatte 90 x 120 (Wallac), Filterbeutel 90 x 120 (Wallac), Szintillationszähler (Wallac)

Durchführung

3H-Thymidin-Lösung: 20 µl 3H-Thymidin-Lösung/ml Kulturmedium (= 20 µCi)

1×10^4 Zellen wurden pro 96-Kammerplatten ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern in Medium (100 µl) behandelt. Die Zellen wurden erneut für 21 h im Brutschrank inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 10 µl 3H-Thymidin-Lösung pro Kammer und eine anschließende dreistündige Inkubation im Brutschrank. Danach wurden die Überstände mit einer 8-Kanalpipette auf eine neue 96-Kammerplatte überführt und auf die Zellen stattdessen 100 µl dH₂O gegeben.

Im „Harvester“ wurde die Filtermatte zunächst einmal mit Wasser gespült, dann wurden beide Platten (Zellen mit 100 µl dH₂O und nur die Überstände) auf die Filtermatte „geerntet“. Die Filtermatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in einen Filterbeutel mit 2,5 ml Betaplast Scint Wallac verschweißt. Der Filterbeutel wurde für die Messung in eine Messkassette gelegt und in den Beta-Zähler gestellt.

2.43. Lipidextraktion

Prinzip

Die Arbeiten werden allgemein nur in Glasbehältern durchgeführt, da die benötigten Lösungsmittel auch Bestandteile aus z.B. Plastikbehältern extrahiert, die zur Kontamination der Lipid-Extrakte führen kann. Neutrale Lipide werden mit Hilfe von unpolaren Lösungsmitteln, wie z.B. Chloroform, extrahiert. Zur Extraktion von Membran-assoziierten Lipiden werden stärker polare Lösungsmittel, wie Ethanol oder Methanol, zur Zerstörung von Hydrogenbindungen oder anderen elektrostatischen Kräften eingesetzt. Reste von Wasser führen zur Kontamination des Lipid-Extrakts, indem es als Lösungsmittel für kleine Moleküle zur Verfügung steht. Aus diesem Grund ist es erforderlich den Wasseranteil des Lipid-Extrakts durch Verdampfen minimieren. Die Verdampfung kleiner Volumina kann unter Stickstoffbegasung erfolgen.

Material

PBS (Gibco BRL), Trypsin/EDTA (Gibco BRL), dH₂O, Methanol (Carl Roth GmbH), Chloroform (Merck), sämtliche Materialien aus Glas (Röhrchen, Pipetten etc.), Ultraschallgerät (Soniprep), Zentrifuge (4 °C), Stickstoffbegasungsanlage (Air Liquide Deutschland GmbH)

Durchführung

Lösungsmittel: Chloroform/Methanol (Verhältnis 9:1)

Die transduzierten Zellen wurden in zwei T175-Flaschen vermehrt, so dass mindestens eine Zellzahl von 2×10^7 erreicht wurde. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach Trypsinierung der Zellen wurden diese gezählt. 2×10^7 Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml dH₂O/Methanol (1:1) resuspendiert und in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Proben wurden anschließend auf Eis mit Hilfe eines Ultraschallgeräts (Soniprep) im Schwingungsbereich von 22 micron beschallt (8 x je 5 Sekunden). Danach erfolgten die Zugabe von 2 ml Chloroform und eine weitere Beschallung auf Eis (2 x je 15 Sekunden). Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die untere Phase wurde nacheinander in 2 ml dH₂O und 2 ml Chloroform resuspendiert und anschließend beschallt (2 x je 15 Sekunden). Dann wurde den Proben jeweils 4 ml Methanol zugefügt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 4000 rpm). Wieder wurde die obere Phase abgenommen und mit dem vorhergehenden Überstand im 40 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. Das Pellet wurde verworfen. Zu den Überständen wurden 5 ml dH₂O und 5 ml Chloroform gegeben und gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben erneut zentrifugiert (10 min bei 4000 rpm). Die untere, organische Phase wurde vorsichtig abpipettiert und

durch Stickstoff-Begasung eingedampft. Die eingetrockneten Lipide wurden mit 90 µl Chloroform/Methanol (9:1) resuspendiert. Die Lipide können entweder bei -70 °C aufbewahrt oder sofort weiter für die Dünnschichtchromatografie eingesetzt werden.

2.44. Dünnschichtchromatografie zur Bestimmung des C_{16/18}-Ceramid-Gehalts

Prinzip

Als stationäre Phase dient solvatisiertes Papier oder ein Dünnschichtmaterial. Entlang der stationären Phase läuft, durch Kapillarkräfte verursacht, die mobile Phase. Dadurch werden auf die stationäre Phase aufgetragene Proben mehr oder weniger gut mittransportiert. Das chromatografische Verhalten eines Stoffes wird durch den R_F-Wert definiert:

$R_F = \text{Wanderungsstrecke der Substanz} / \text{Wanderungsstrecke des Laufmittels}$

Dieser Wert ist eine stoffspezifische Konstante und ist für einen Stoff abhängig von der Art des Dünnschichtmaterials und der Zusammensetzung des Laufmittels.

Material

Chloroform (Merck), Dichlormethan (Carl Roth GmbH), Methanol (Carl Roth GmbH), Essigsäure (Merck), Ceramidgemisch aus C16 und C18-Ceramiden als Standard (Serva), Kupfersulfat (Merck), Phosphorsäure (Merck), Filterpapier, Dünnschichtchromatografie-Platte (Merck), Laufkammer (Hilgenberg GmbH), Heizplatte (100 und 180°C), vertikale Glaskammer (Hilgenberg GmbH), 2D-Durchlicht-Laser-Scanner

Durchführung

Vor-Laufmittel: Chloroform/Methanol (2/1)

Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/Essigsäure (100/2/5)

Ceramid-Standard: 1 nM, 2,5 nM und 5 nM

Kupfersulfat/Phosphorsäure-Lösung: 10 % (w/v) Kupfersulfat in 8 %iger Phosphorsäure gelöst.

Diese Methode wurde freundlicherweise unter Anleitung von Herrn Dr. Winoto-Morbach aus dem Institut für Immunologie (Kiel) durchgeführt.

Die Dünnschichtchromatografie (DC)-Platte wurde zunächst beschriftet und für ca. 30 Minuten in den Vor-Laufpuffer gestellt. Anschließend wurde die DC-Platte bei 80 °C getrocknet. In die Laufkammer wurden 100 ml des Laufmittels eingefüllt, an den Seiten der Laufkammer wurden zwei Filterpapiere eingelegt und so die Kammer für ca. eine Stunde vor Gebrauch äquilibriert.

Die Proben und der Standard wurden auf die DC-Platte aufgetüpfelt (Doppelbestimmung). Nachdem die Proben eingetrocknet waren, wurde die DC-Platte vorsichtig in die äquilibrierte Laufkammer gestellt und für ca. 18 Minuten laufen gelassen (bis die Lauffront oben angelangt war).

Nach dem Lauf wurde die DC-Platte wieder aus der Kammer genommen und für ca. 10 Minuten bei 180 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Nachdem sie wieder abgekühlt war, wurde die DC-Platte bei Raumtemperatur für 15 Sekunden in einer Kupfersulfat/Phosphorsäure-Lösung in einer vertikalen Glaskammer getaucht. Anschließend wurde die DC-Platte sofort wieder auf eine Heizplatte für zwei Minuten bei 100 °C zum Trocknen gelegt. Die Veraschung der Lipide erfolgte durch Aufheizen der DC-Platte auf 180 °C für ca. fünf bis zehn Minuten. Die Lipide erscheinen als braune Banden. Diese Banden wurden letztlich in einem 2D-Durchlicht-Laser-Scanner quantifiziert (Durchführung von Herrn Dr. Winoto-Morbach). Die Leervektorkontrolle wurde auf 100 % gesetzt.

2.45. Differenzierungs-Microarray

Durchführung

Die Epimorphin-transduzierten A818-6 und A818-4-Zellen wurden bis zur Subkonfluenz in T175-Flaschen kultiviert. Die RNA-Isolierung erfolgte wie bereits beschrieben mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und dem RNase-Free DNase Set (Qiagen). Diese RNA-Proben wurden noch auf Verunreinigungen durch genomische DNA mittels PCR zum Nachweis von GAPDH überprüft. Für den Array wurden total RNA-Mengen von 40 µg eingesetzt, wobei die Konzentration nicht unter 3,5 µg/µl lag.

Der Microarray und die Analyse wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Häsler aus der 1. Medizinischen Klinik (Kiel) durchgeführt.

<http://www.mucosa.de/microarrays/>

3. Ergebnisse

3.1. Die Rolle von Epimorphin in der Entwicklung von A818-6 „hollow spheres“

3.1.1. Hypothese

Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bildung von Hohlkugeln („hollow spheres“) der dukalen Pankreasadenokarzinom-Zelllinie A818-6 durch die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers (MC1, 50 µg/ml) gegen den morphoregulatorischen Faktor Epimorphin verhindert wird. Des weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Epimorphin-Expression und der Fähigkeit zur Lumenbildung verschiedener Zelllinien festgestellt werden (**Abbildung 8**). Zellen, die ein Lumen ausbilden, exprimieren immer die 34 kDa Isoformen (I und II), während die Zellen, die diese Fähigkeit nicht besitzen, entweder gar kein Epimorphin oder nur die 31 kDa Isoform (III) produzieren. Im Vergleich zu den A818-6 „monolayer“-Zellen nimmt in den „hollow spheres“ die Expression der 31 kDa –Isoform zugunsten der großen Isoformen ab.

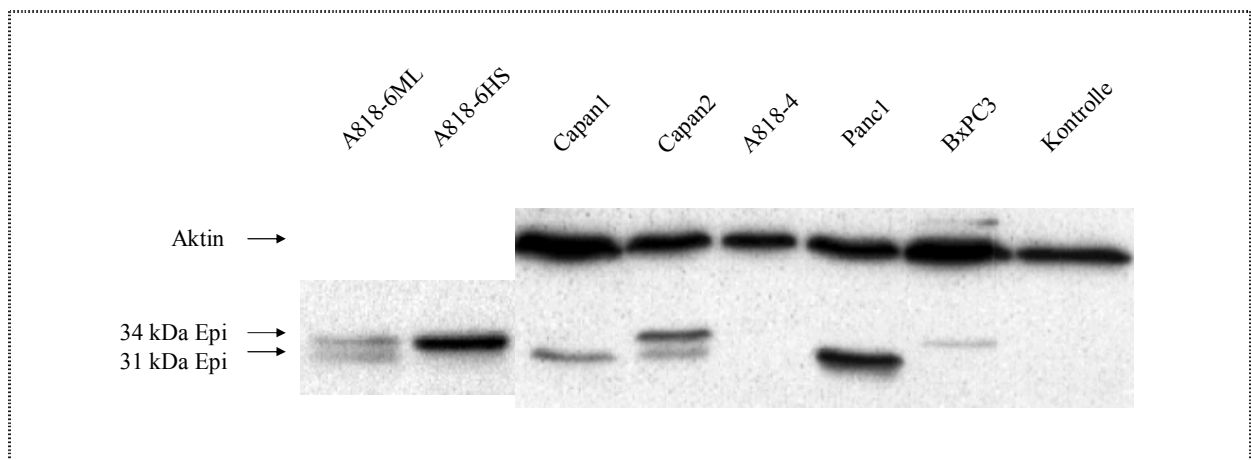


Abbildung 8: Westernblot-Analyse zur Detektion von Epimorphin. ML = „monolayer“; HS = „hollow spheres“; Epi = Epimorphin (Bild aus der Dissertation von L. Lehnert.)

Aufgrund dieser Daten wurde vermutet, dass insbesondere die 34 kDa Epimorphin-Isoformen eine Funktion in der Initiation der Morphogenese einnehmen. Der Schwesternklon zu A818-6, A818-4, zeigte im Westernblot keine Epimorphin-Expression. A818-4 entwickelt unter 3D-Kulturbedingungen kompakte Sphäroide, die aus mehreren Hundert Zellen bestehen können. Ziel war es, die verschiedenen Epimorphin-Isoformen in A818-4 zu überexprimieren und die ggf. daraus resultierenden morphologischen Effekte zu charakterisieren.

3.1.2. Lokalisation des Epimorphin in A818-6 und A818-4-Zellen

Zunächst wurde mit Hilfe der Immunzytochemie die Epimorphin-Expression und -Verteilung in den beiden Subklonen A818-6 und A818-4 untersucht.

Die immunzytochemischen Analysen zeigten eine diffuse Verteilung des Epimorphin, das vorwiegend zytoplasmatisch, in A818-6 aber auch membranständig lokalisiert war (**Abbildung 9**). Es war zwar entgegen der vorherigen Westernblot-Daten auch eine Epimorphin-Färbung in A818-4 zu erkennen, aber in ihrer Intensität deutlich geringer als in A818-6. Ein weiterer interessanter Unterschied war das Fehlen membranständigen Epimorphins in A818-4-Zellen. Die Färbung von SNAP23 („synaptosomal-associated protein“)⁶ erfolgte, um das Färbemuster eines t-SNARE Proteins vergleichend vor Augen zu haben und um eine mögliche Kolokalisation von SNAP23 und Epimorphin zu offenbaren, die sehr vereinzelt vorzufinden war.

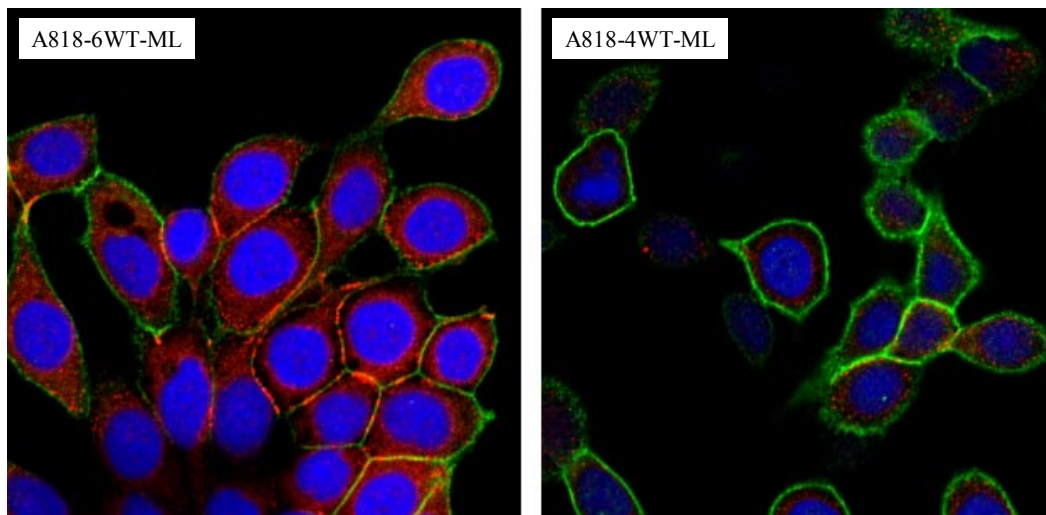


Abbildung 9: Epimorphin-Färbung. Immunzytochemie: SNAP23-Färbung (grün), Epimorphin-Färbung (rot), Kern-Färbung (blau). WT = Wildtyp; ML = „monolayer“. Konfokale Mikroskopie.

Durchflusszytometrie-Analysen von nicht permeabilisierten A818-6-Zellen zeigten, dass neben dem intrazellulären Vorkommen, Epimorphin auch auf der Zelloberfläche detektierbar war (**Abbildung 10**).

⁶ bindet u.a. an verschiedene Syntaxine und ist ein wichtiger Regulator für das Andocken und die Fusion von Transportvesikeln.

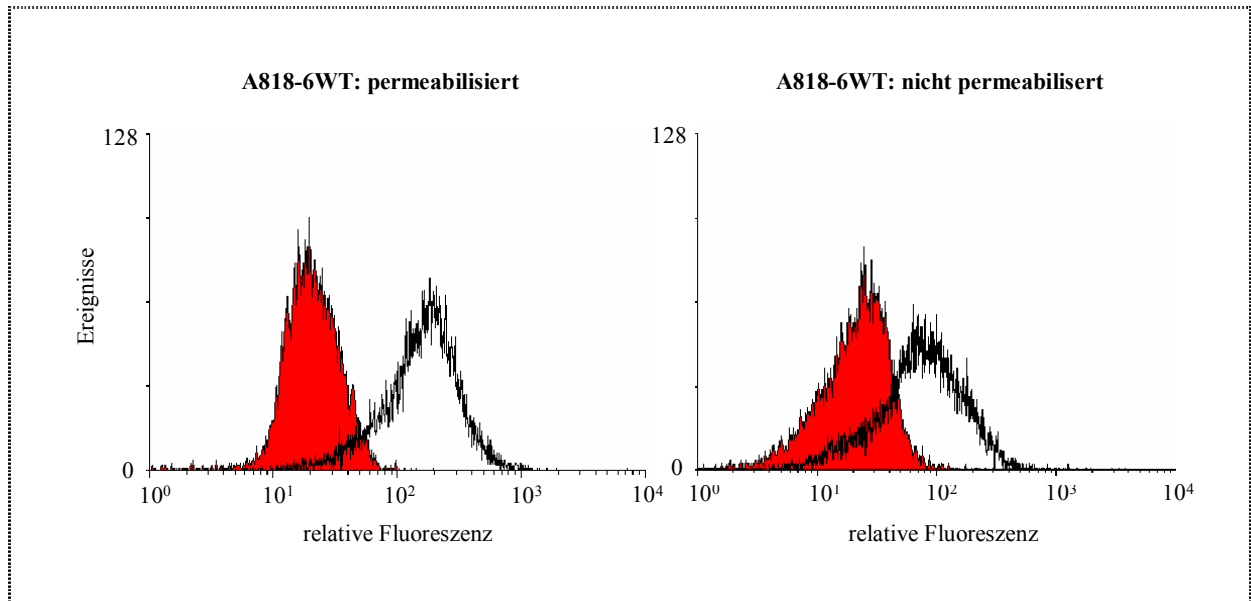


Abbildung 10: FACS-Analyse: Epimorphin-Nachweis im Cytoplasma (permeabilisiert) und an der Zelloberfläche (nicht permeabilisiert)

3.1.3. Herstellung Epimorphin-überexprimierender A818-4 und A818-6-Zellen mittels retroviraler Transduktion

Um eine Aussage über möglicherweise differente Funktionen der verschiedenen Isoformen geben zu können, wurden die A818-6 - und A818-4 - Zellen stabil mit vorerst je einer Epimorphin-Isoform und anschließend mit verschiedenen Epimorphin-Isoform-Kombinationen transduziert. Die transduzierten Zellen wurden für ca. zwei Wochen in einem Selektionsmedium (A818-6 mit 1 mg/ml bzw. A818-4 mit 700 µg/ml G418) gehalten. Als Kontrolle dienten die Wildtypzellen, die in Anwesenheit von G418 innerhalb der Selektionsdauer starben.

3.1.3.1. Detektion von Epimorphin im Gesamtzell-Lysat

Eine starke Überexpression der jeweiligen Isoform konnte in beiden Zelllinien mittels Westernblot nachgewiesen werden (**Abbildung 11**). Jedoch resultierte daraus keine gesteigerte Komplexbildung zu Dimeren oder Tetrameren (hier nicht gezeigt).

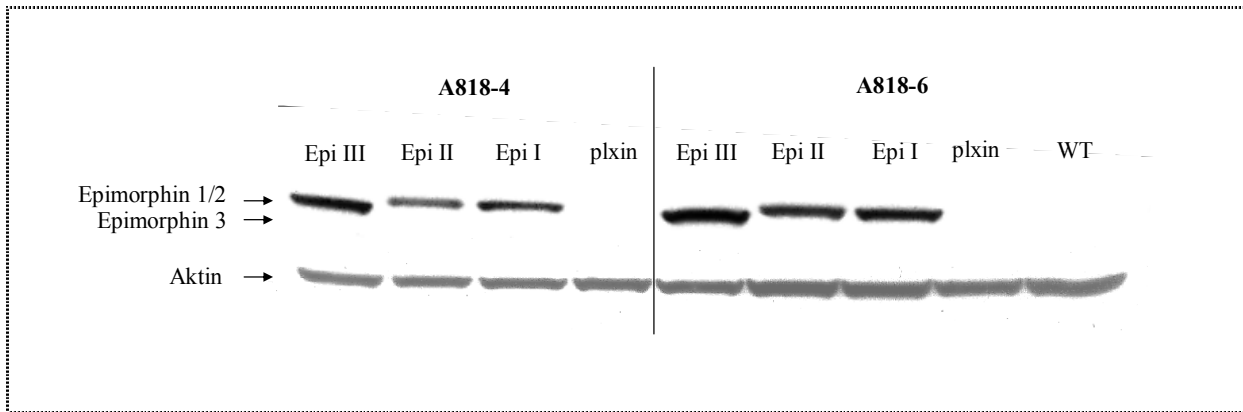


Abbildung 11: Detektion von Epimorphin mittels Westernblot. Epimorphin-überexprimierende A818-4- und A818-6-Zellen (EpiI, II und III steht für Epimorphin-Isoform I, II und III). Der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle. Kein Nachweis der endogenen Epimorphin-Expression infolge der relativ kurzen Expositionszeit.

3.1.3.2. Detektion des Epimorphin im Mediumüberstand der transduzierten Zellen

Der aufkonzentrierte FCS-freie Mediumüberstand wurde auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Westernblot konnte Epimorphin im Überstand der überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 12**). Die detektierten Banden lagen allerdings nicht in der erwarteten Höhe, sondern bei ca. 30 kDa, wie auch üblicherweise die Epimorphin-Isoform III. Die Isoform II wurde in beiden Zelllinien in zwei Produkte gespalten, ein Produkt lag bei 30 kDa und das zweite Produkt wurde etwas unterhalb von 30 kDa detektiert.

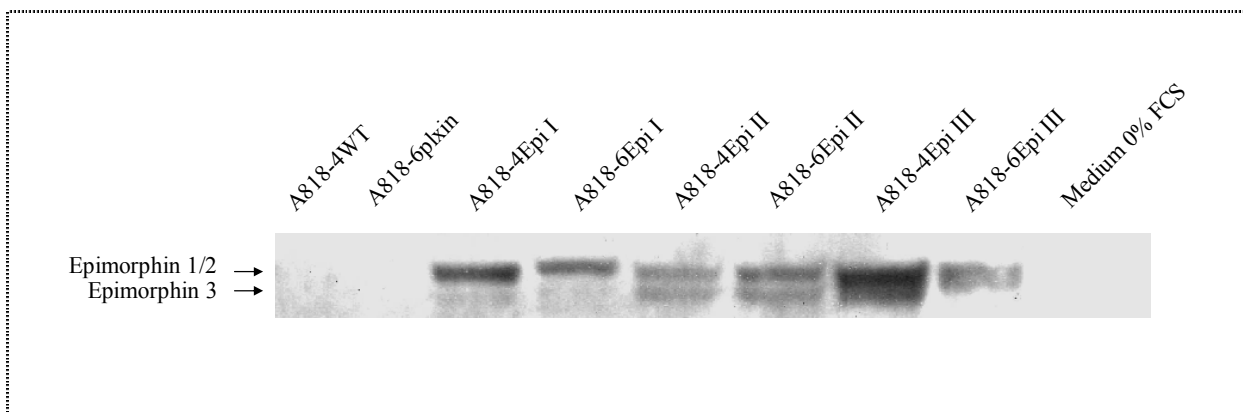


Abbildung 12: Detektion von Epimorphin im Mediumüberstand. Epimorphin im Mediumüberstand ohne FCS von transduzierten und Wildtyp-Zellen mittels Westernblot detektiert.

3.1.3.3. Detektion des Epimorphin im Gesamtzell-Lysat nach simultaner Transduktion verschiedener Epimorphin-Isoform-Kombinationen in A818-4-Zellen

Da bisher nicht bekannt ist, welche Isoform für die morphoregulatorische Funktion verantwortlich ist, oder ob ein Zusammenspiel mehrerer Isoformen eine funktionelle Bedeutung hat, wurden mehrere Isoform-Kombinationen in die A818-4-Zellen retroviral eingebracht. Westernblot-Analysen bestätigten die Überexpression der jeweiligen Isoformen (**Abbildung 13**).

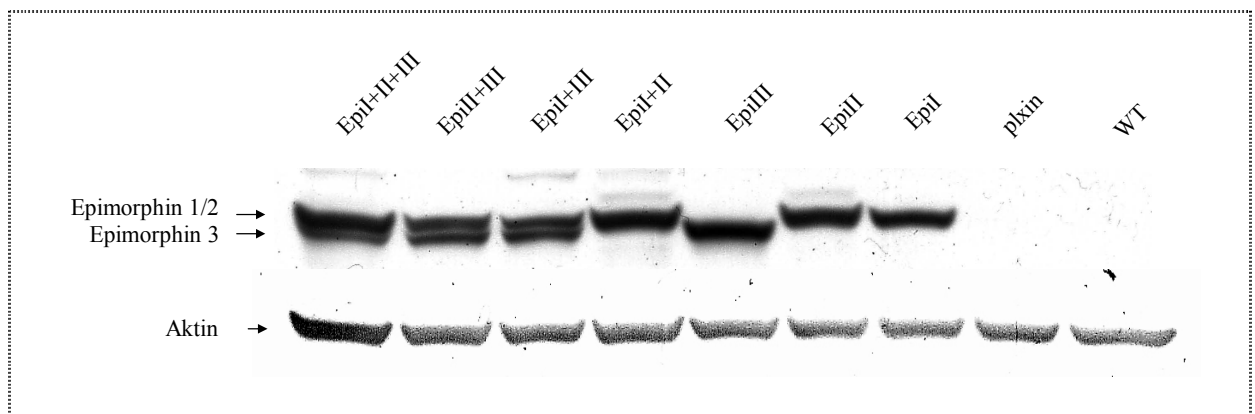


Abbildung 13: Epimorphin-Detektion mittels Westernblot. A818-4-Zellen mit mehreren Epimorphin-Isoformen transduziert. Beschriftung: Wildtyp (WT), Leervektor (plxin), Epimorphin-Isoform I (EpiI), Epimorphin-Isoform II (EpiII), Epimorphin-Isoform III (EpiIII).

3.1.4. Morphologische Untersuchungen an Epimorphin-überexprimierenden Zellen

3.1.4.1. Morphologie der Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen

Unter Standardkulturbedingungen konnten keine morphologischen Veränderungen nachgewiesen werden (**Abbildung 14**).

Die 3D-Kultivierung der transduzierten Zellen sollte Aufschluss darüber geben, ob Epimorphin eine Lumenbildung induziert (**Abbildung 15**).

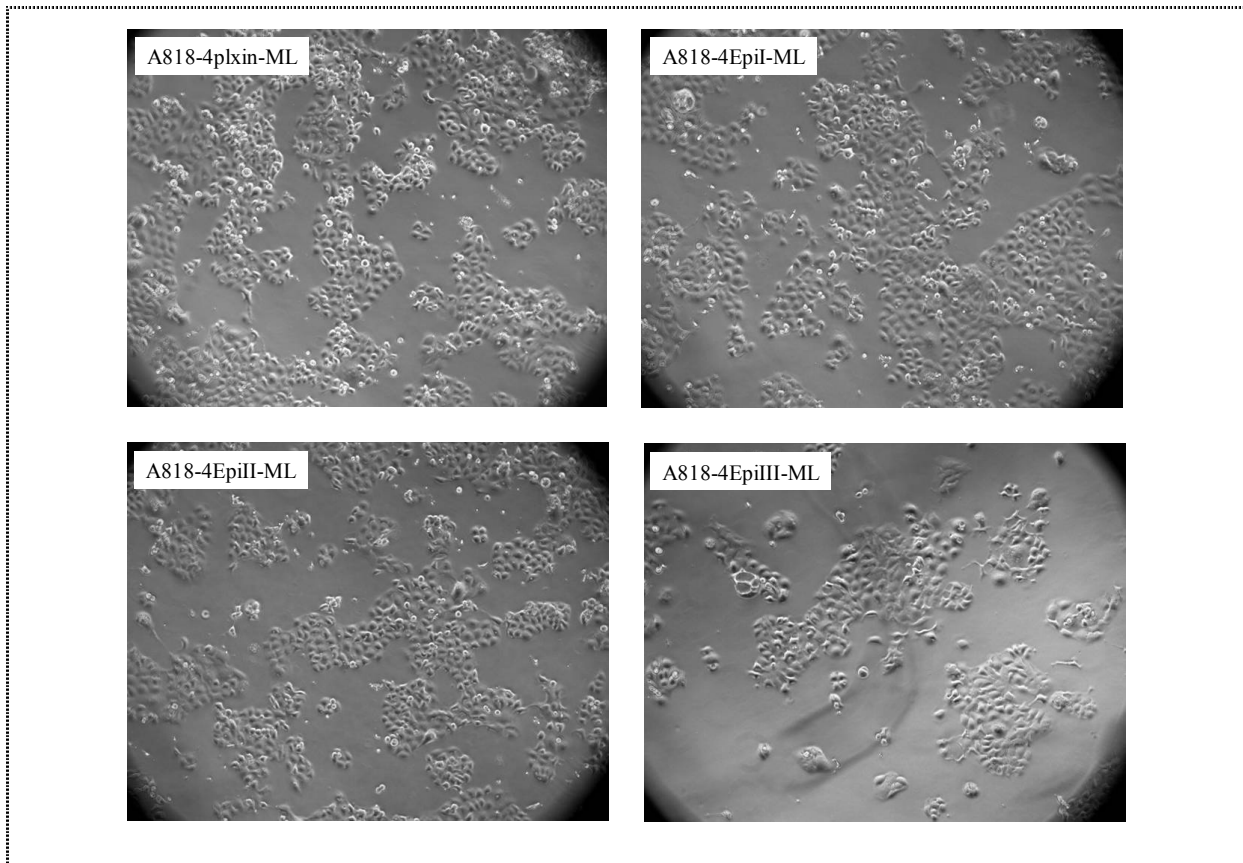
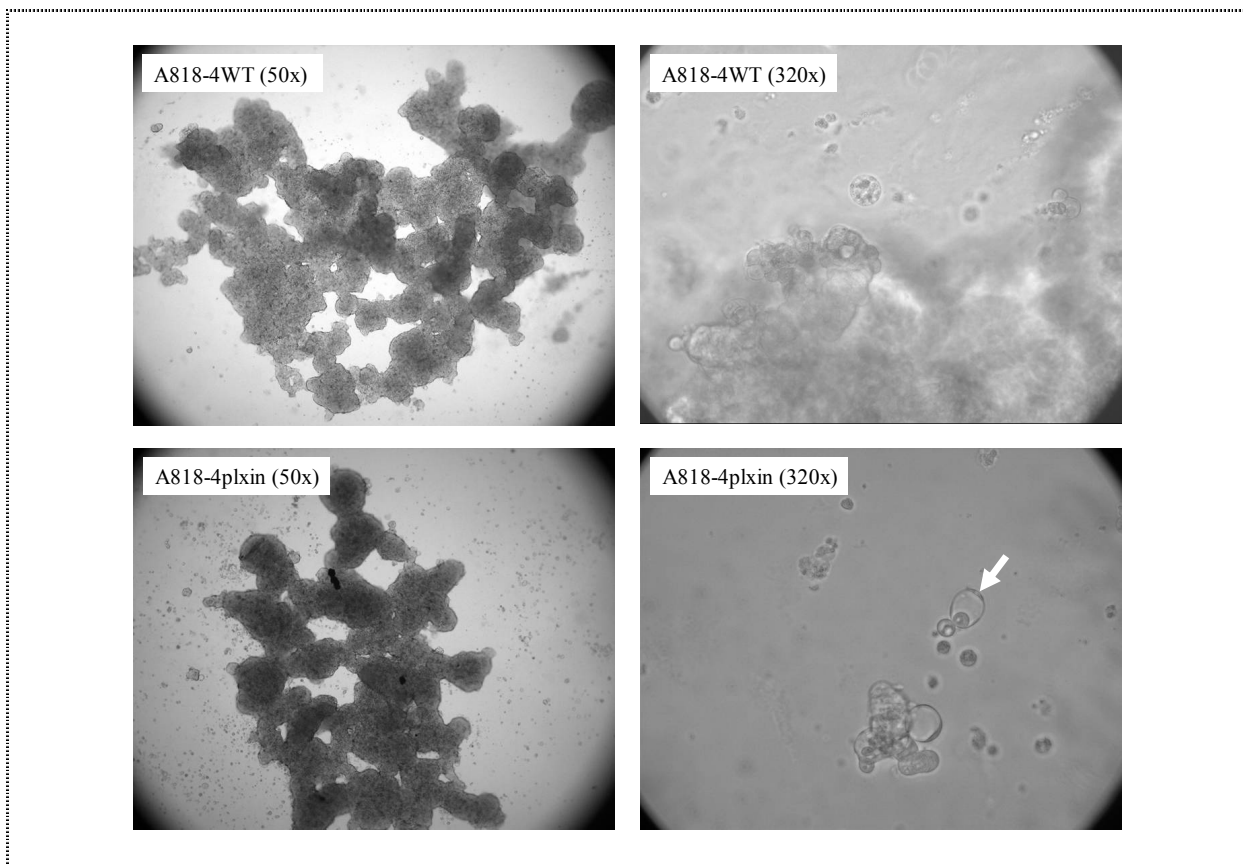


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen unter Standardkulturbedingungen (2D). 100fache Vergrößerung.



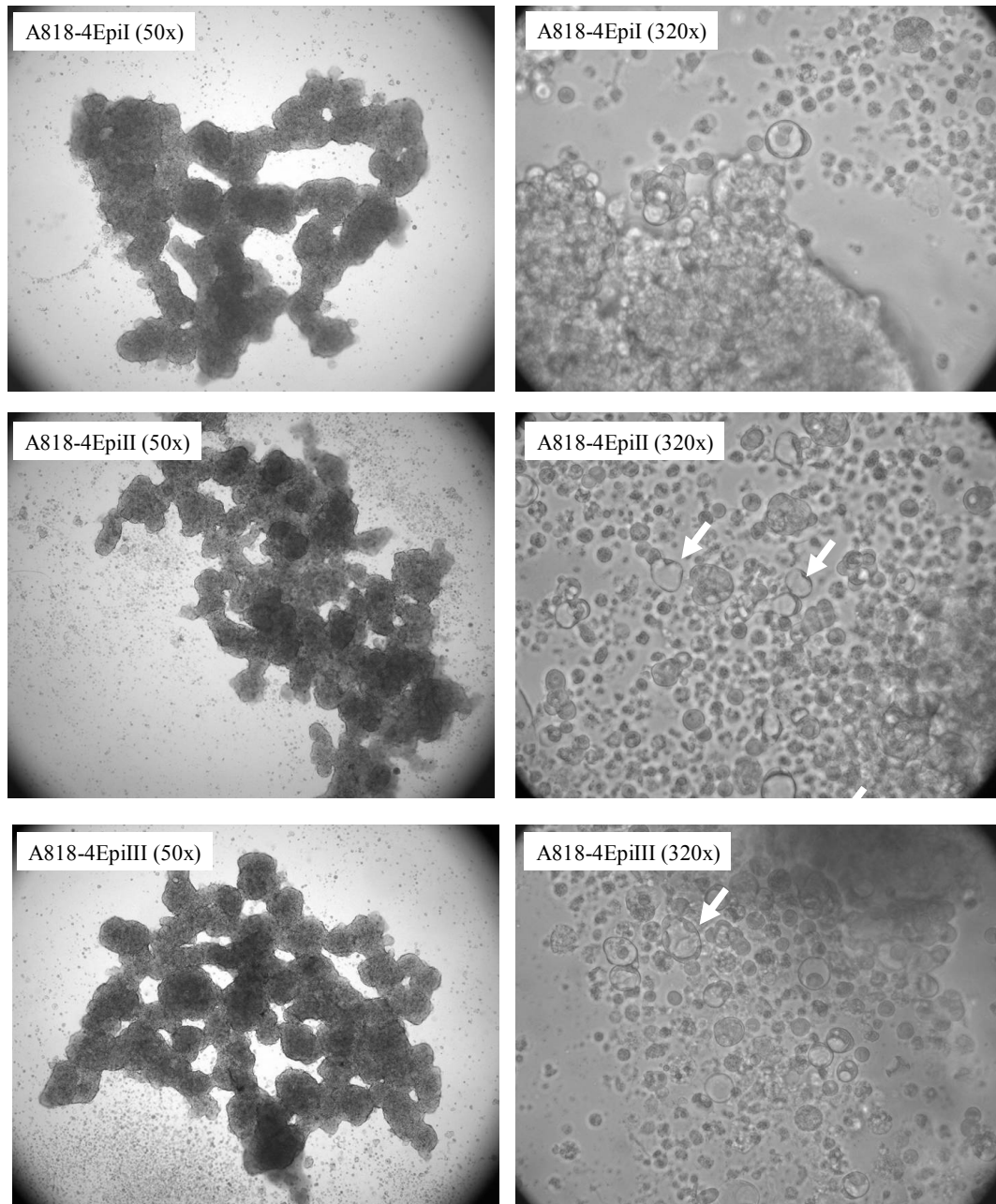


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A818-4-Transduktanten unter 3D-Kulturbedingungen nach vier Tagen. Weißer Pfeil zeigt auf Siegelring-ähnliche Zellen. Darstellung jeweils in zwei Vergrößerungen (50fach und 320fach).

Die mehrfach transduzierten A818-4-Zellen wurden ebenfalls morphologisch unter 3D-Kulturbedingungen untersucht, da möglicherweise mehrere Isoformen für die Induktion der Lumenbildung benötigt werden (**Abbildung 16**).

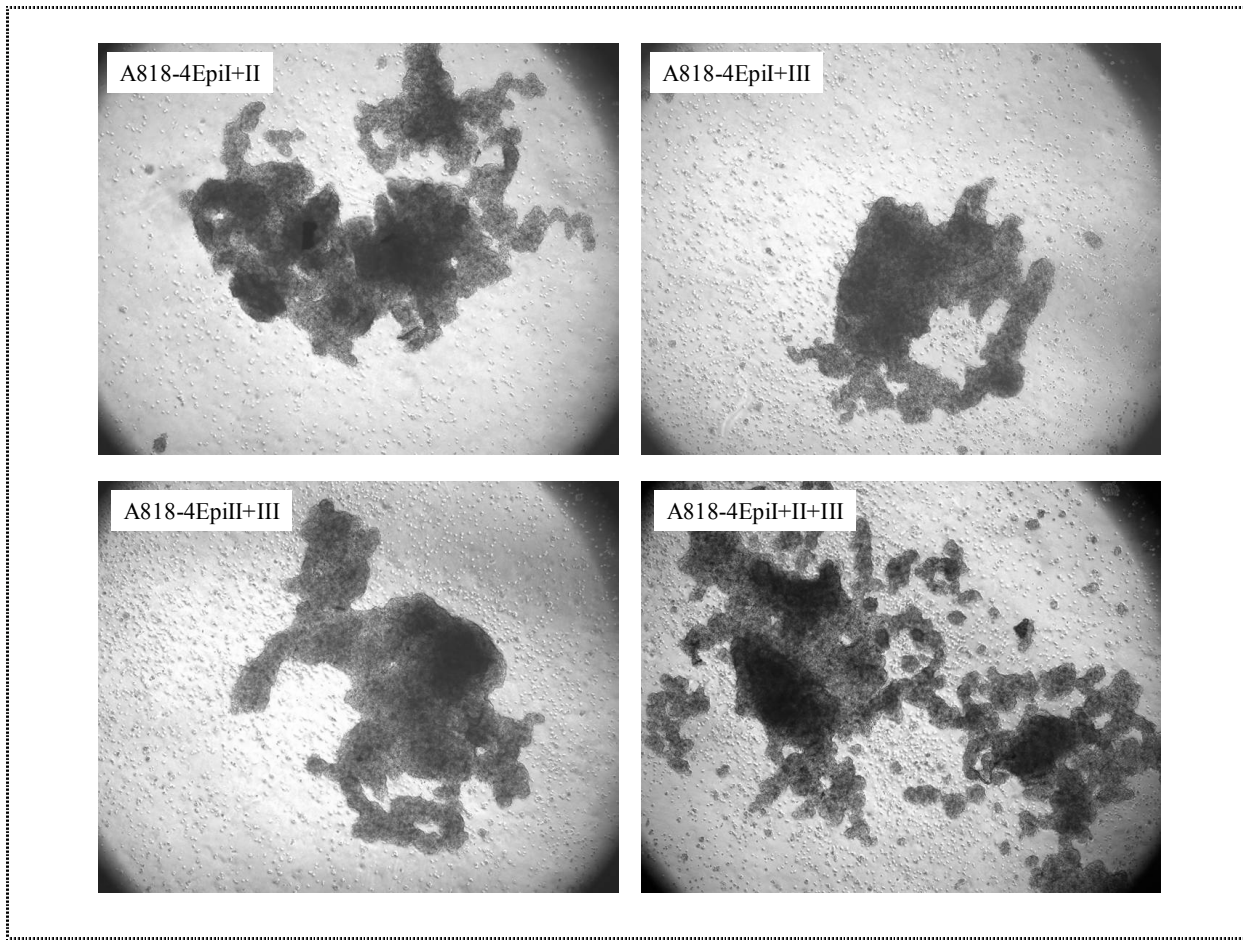


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen der mehrfach transduzierten A818-4-Zellen unter 3D-Kulturbedingungen nach acht Tagen. 50fache Vergrößerung.

Weder eine Epimorphin-Isoform noch die Kombination aus mehreren Isoformen vermochte eine Lumenbildung in den A818-4-Zellen zu induzieren.

Zum Teil wurden vermehrt Siegelring-ähnliche Zellen nachgewiesen, insbesondere in Epimorphin-Isoform II- und III-überexprimierenden A818-4-Zellen, jedoch stellte sich dieser Phänotyp als nicht reproduzierbar dar (**Abbildung 15**).

Überführt man die A818-4-Sphäroide wieder auf unbeschichtete Zellkulturplatten, so adhären diese im Gegensatz zu A818-6-“hollow spheres“. Auch die transduzierten A818-4-Sphäroide zeigten diesbezüglich kein anderes Verhalten (nicht gezeigt).

3.1.4.2. Morphologie der Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen

Der Phänotyp der Zellen wurde sowohl unter Standardkulturbedingungen als auch unter 3D-Kulturbedingungen betrachtet (**Abbildung 17**). Aber wie schon bei den transduzierten A818-4-Zellen zeigte sich auch hier keine Veränderung in der Morphologie. Auch der Entwicklungsprozess beschleunigte oder verlangsamte sich infolge der Epimorphin-Überexpression nicht.

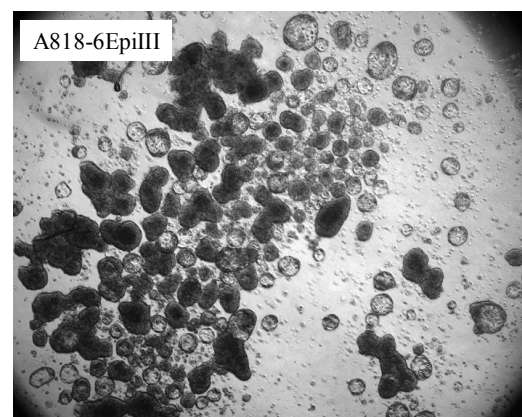
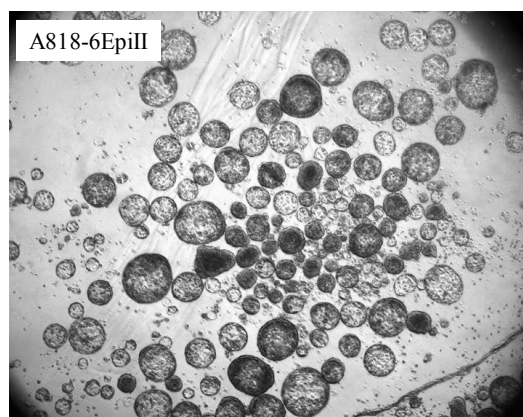
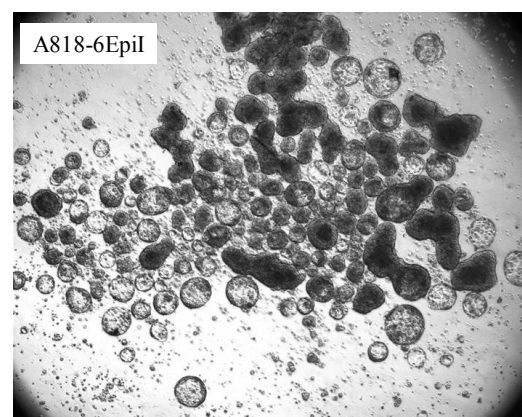
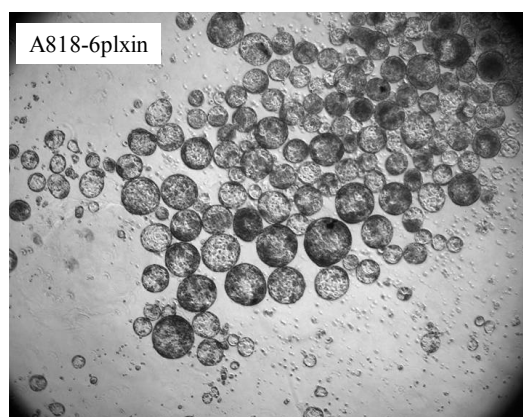
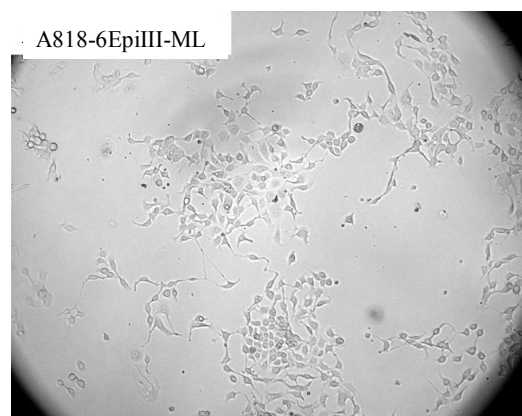
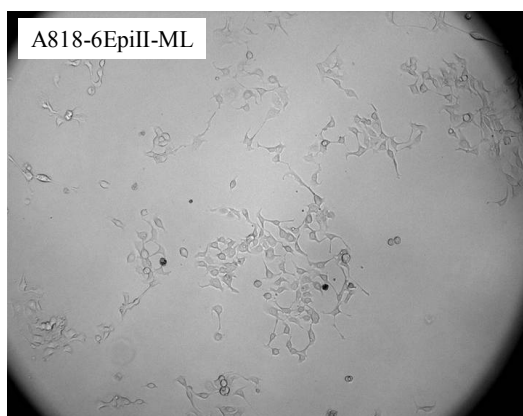
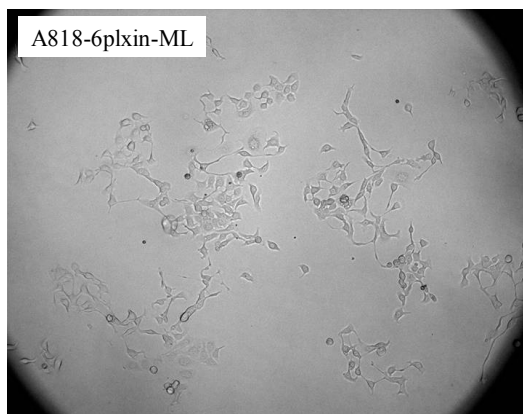


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von transduzierten A818-6-Zellen unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen. ML steht für „monolayer“ und spiegelt den Phänotyp unter Standardkulturbedingungen (2D) wider. Die Aufnahmen der 3D-Kultur erfolgten nach sieben Tagen. 50fache Vergrößerung.

3.1.4.3. Kokultivierung der Epimorphin-transduzierten A818-4-Zellen

Die durchgeführten Kokultur-Experimente im Überblick:

1. Lösliche Faktoren: A818-4-Transduktanten ...
 - 1.1. mit A818-6 ML (Transwells) (**Abbildung 18**)
 - 1.2. mit A818-6 HS (Transwells) (**Abbildung 18**)
 - 1.3. mit konditioniertem Medium aus verschiedenen Phasen der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung (nicht gezeigt)
2. Zell/Zell-Kontakt: A818-4-Transduktanten ...
 - 2.1. untereinander (z.B.: A818-4EpiI mit A818-4EpiII usw.) (nicht gezeigt)
 - 2.2. auf A818-6 ML (nicht gezeigt)
 - 2.3. mit A818-6 EGFP (nicht gezeigt)
 - 2.4. auf KIF-5-ML (**Abbildung 19**)
 - 2.5. mit KIF-5 EGFP (nicht gezeigt)

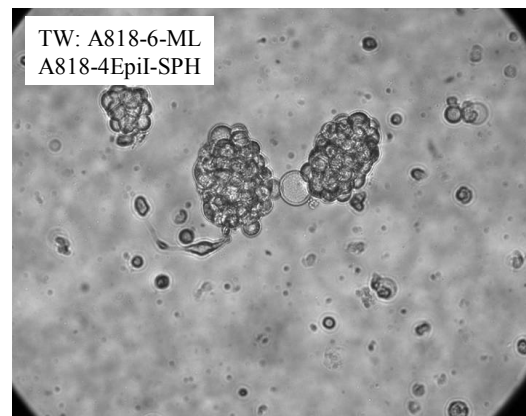
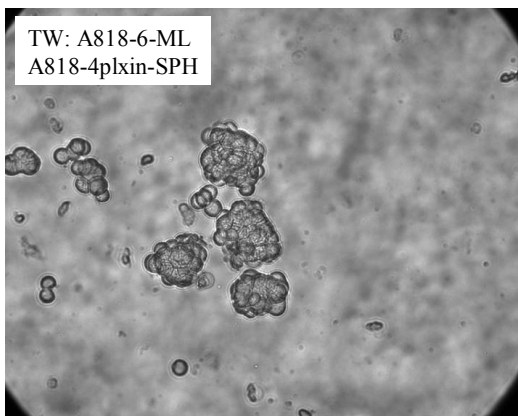
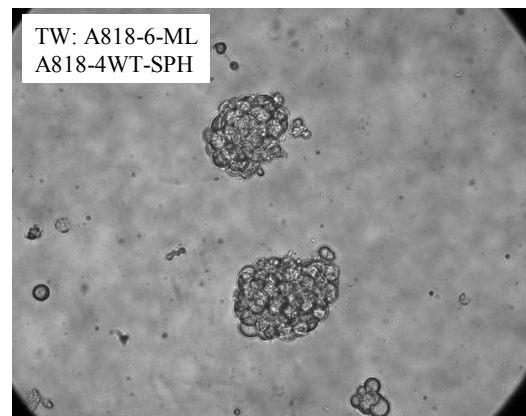
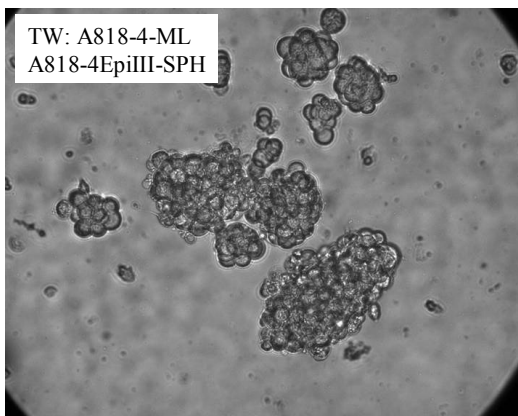
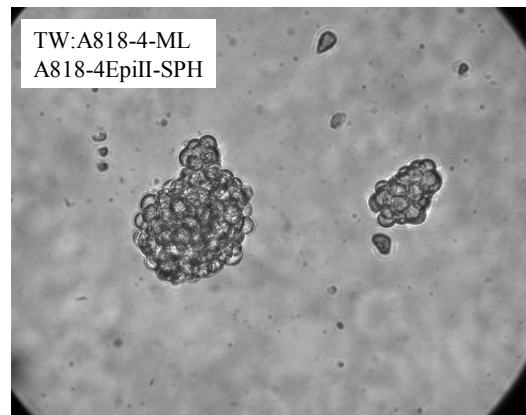
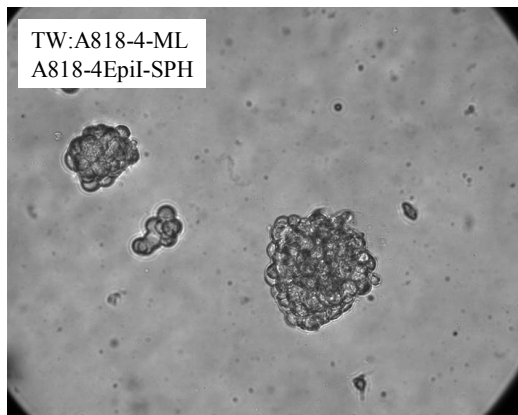
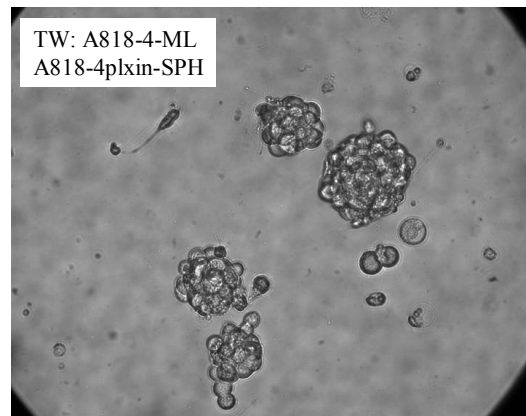
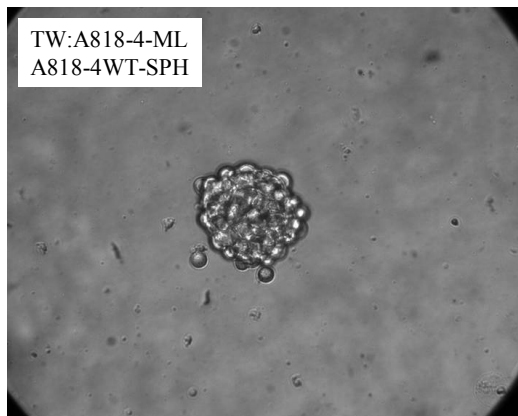
Da es zu keinen morphologischen Veränderungen kam, werden hier nur Aufnahmen aus einigen Experimenten repräsentativ dargestellt.

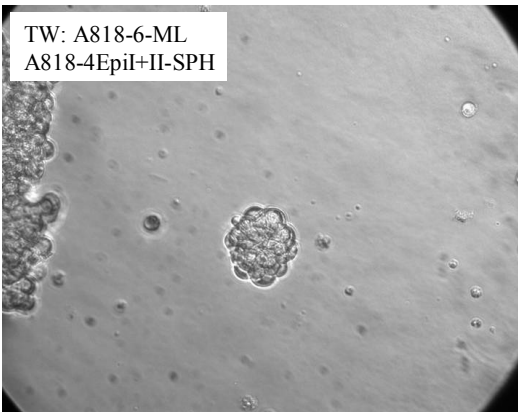
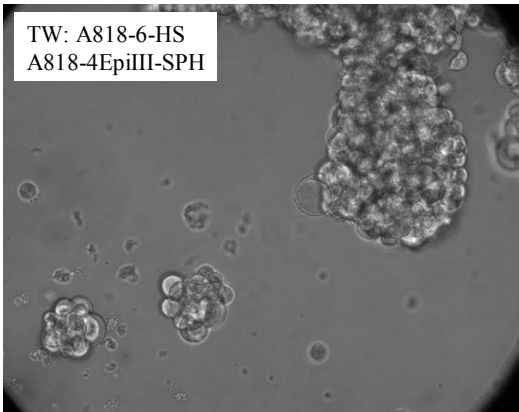
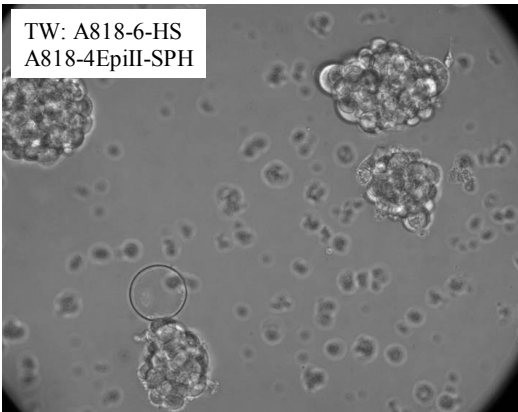
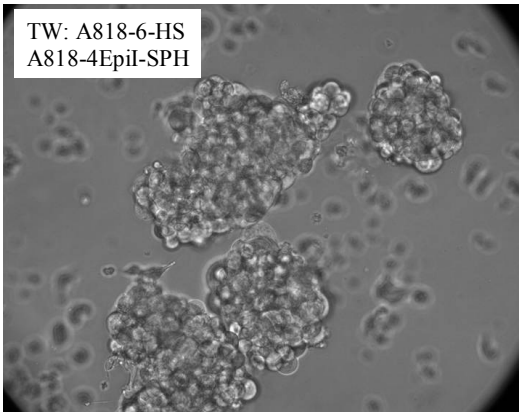
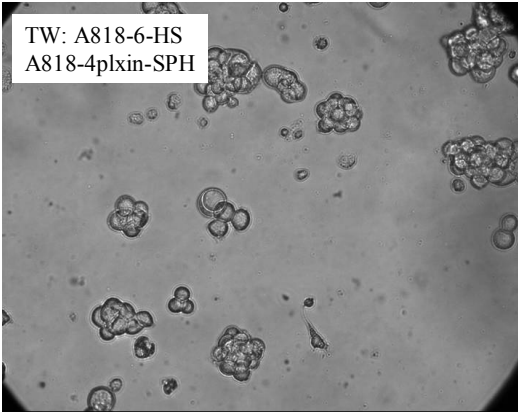
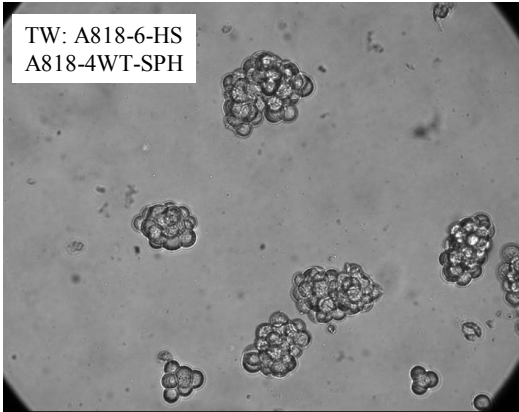
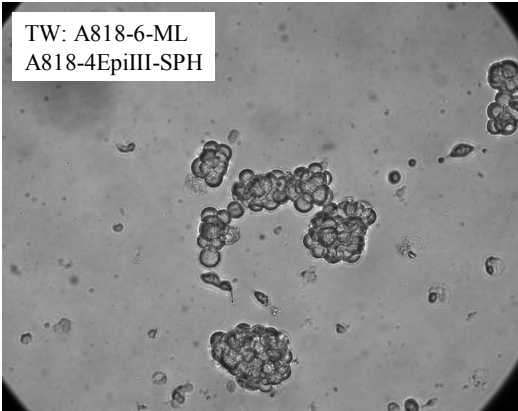
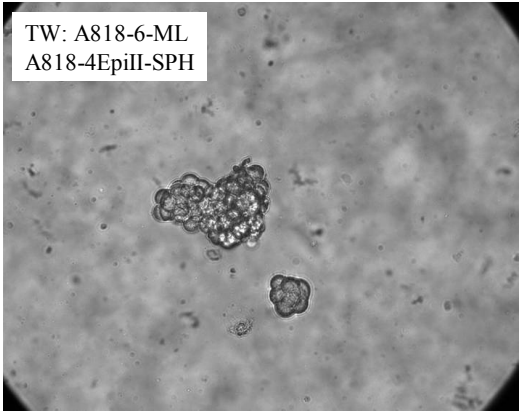
Zu 1.1 und 1.2 (Abbildung 18)

Da möglicherweise neben Epimorphin noch weitere autokrin wirkende Proteine an dem Differenzierungsvorgang der A818-6-Zellen unter 3D-Kulturbedingungen beteiligt sind, wurden die transduzierten A818-4-Zellen mit A818-6 „monolayer“-Zellen sowie mit A818-6-„hollow spheres“ kokultiviert. Hierbei wurden die A818-4-Zellen auf Agarose-beschichteten 6-Kammerplatten ausgesät. Zusätzlich befand sich über den A818-4-Zellen ein Transwell mit A818-6-„monolayer“-Zellen oder ein Transwell mit bereits ausgereiften A818-6-„hollow spheres“. Durch die Poren des Transwells konnten ins Medium sezernierte Proteine zu den A818-4-Zellen diffundieren, ohne dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt zustande kam.

Zu 1.3 (nicht dargestellt)

Um zu überprüfen, ob Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der „hollow sphere“-Entwicklung von den A818-6-Zellen ins Medium abgegeben werden, die morphoregulatorische Funktionen übernehmen, wurden transduzierte und Wildtyp A818-4-Zellen mit konditioniertem Medium behandelt. Es wurden dazu die Zelllinien A818-4, A818-4plxin, A818-4EpiI, A818-4EpiII, A818-4EpiIII und A818-6WT simultan auf Agarose-beschichteten Platten ausgesät. Nach 24, 48 und 72 h wurde Medium aus der A818-6-Kultur in die A818-4-Kulturen transferiert (hier nicht gezeigt).





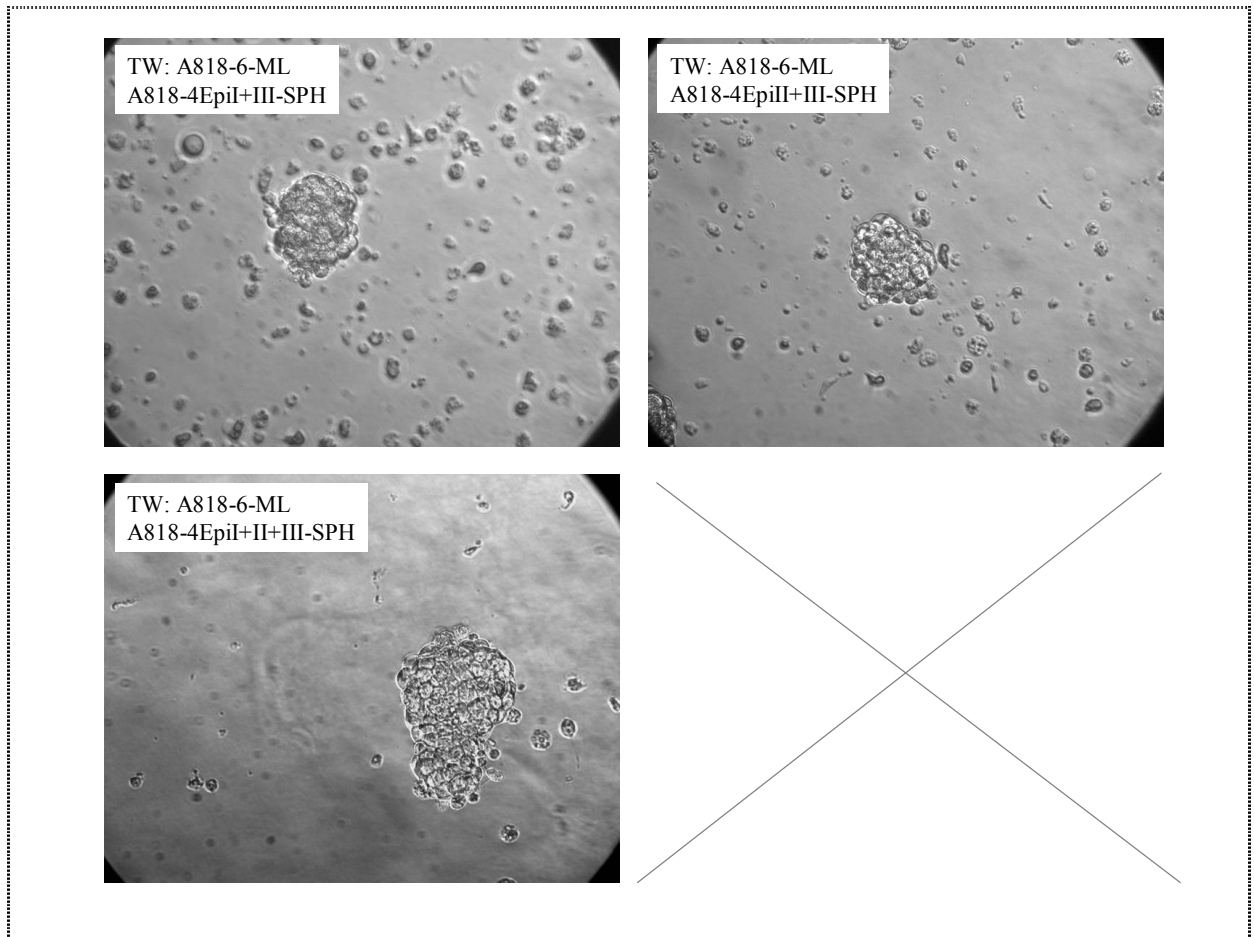


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kokultivierungen von verschiedenen transduzierten A818-4-Sphäroiden mit entweder A818-4 ML, A818-6 ML oder A818-6 HS in Transwells (TW). 320fache Vergrößerung.

Zu 2.1 (nicht dargestellt)

Da möglicherweise mehrere Isoformen die Morphogenese beeinflussen, wurden zunächst die mit je einer Epimorphin-Isoform transduzierten A818-4-Zellen in allen Kombinationen untereinander kokultiviert. Dabei wurden die Zellen in einem äquivalenten Verhältnis gemischt und auf Agarose-beschichteten Zellkulturplatten ausgesät.

Kokultur von :

A818-4Epi I/A818-4Epi II

A818-4Epi II/A818-4Epi III

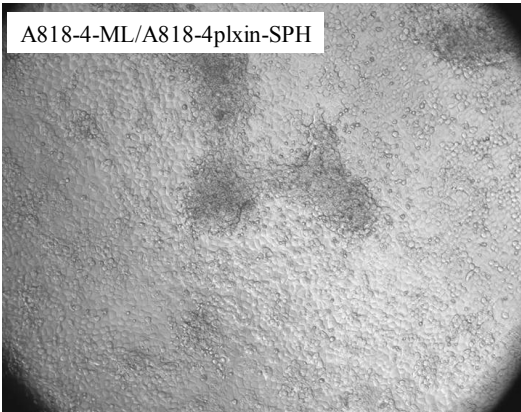
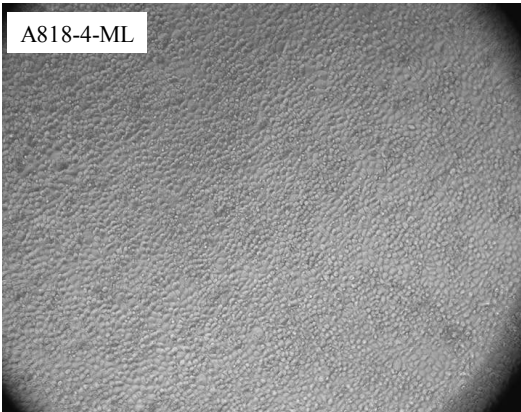
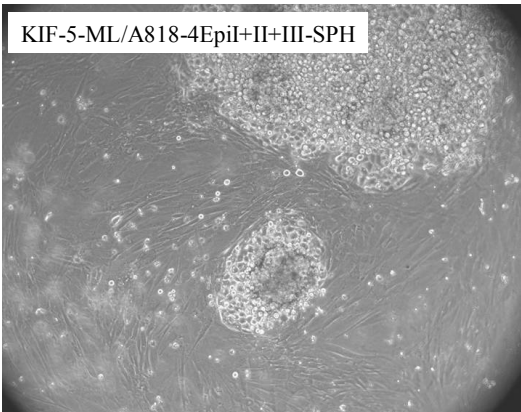
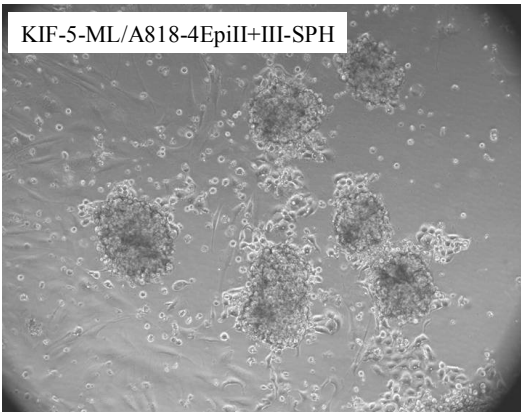
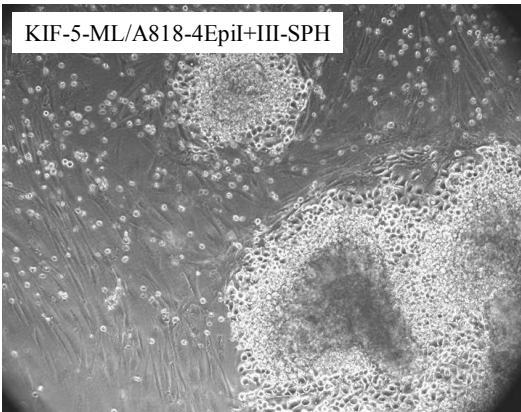
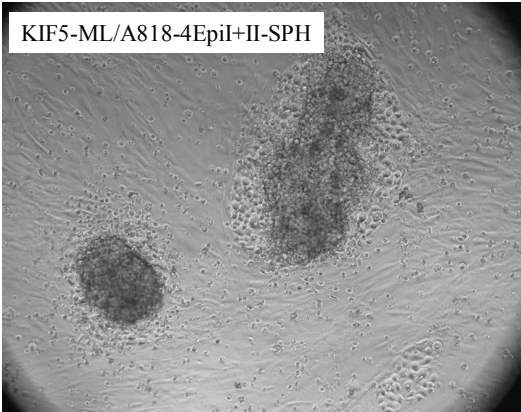
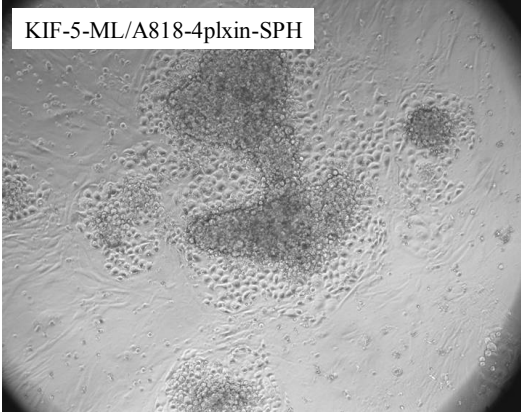
A818-4Epi I/A818-4Epi II/A818-4Epi III

Negativkontrolle: A818-4WT und A818-4plxin

Positivkontrolle: A818-6 WT und A818-6plxin

Zu 2.2 und 2.3 (nicht dargestellt)

Des weiteren wurde untersucht, ob ein Zell-Zellkontakt mit der lumenbildenden A818-6 Zelllinie die Sphäroidentwicklung der verschiedenen transduzierten A818-4-Zellen beeinflusst. Dazu wurden Sphäroide der A818-4-Epimorphin-Transduktanten auf einen konfluenten „monolayer“ aus A818-6



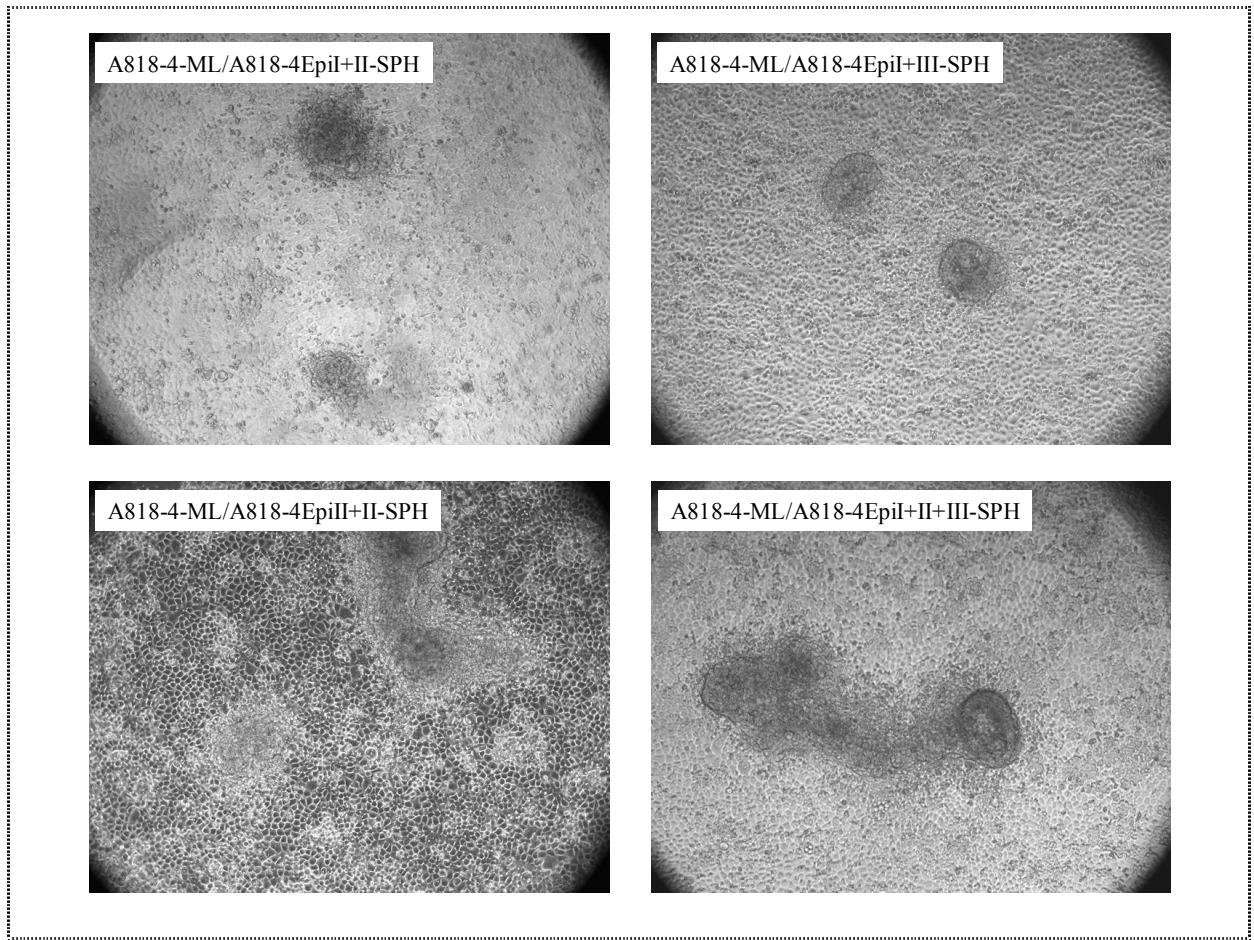


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mehrfach transduzierten A818-4-Sphäroiden, ausgesät auf einem KIF-5-„monolayer“-Rasen oder zur Kontrolle auf einem A818-4-Wildtyp-„monolayer“-Rasen. Abkürzungen: „monolayer“ (ML), Sphäroide (SPH), z.B.: Epimorphin-Isoform I und Epimorphin-Isoform II überexprimierende A818-4-Zellen (A818-4EpiI+II). Die Aufnahmen erfolgten nach dem fünften Tag. 100fache Vergrößerung.

WT-Zellen ausgesät und über drei Tage hinweg lichtmikroskopisch begutachtet (nicht gezeigt). Außerdem wurden die A818-4-Transduktanten in einem äquivalenten Verhältnis mit EGFP-transduzierten A818-6-Zellen gemischt und unter 3D-Bedingungen kokultiviert (nicht gezeigt). Neben hauptsächlich kompakten Sphäroiden entwickelten sich auch vereinzelt „hollow spheres“ aus, die jedoch ausschließlich aus A818-6-Zellen bestanden, wie mittels Fluoreszenzmikroskopie an der Expression des grünfluoreszierenden EGFP-Proteins zu erkennen war (nicht gezeigt). Es wurden demnach weder A818-4-Zellen in die „hollow sphere“-Struktur integriert noch kam es zu einer Lumenbildung in A818-4-Sphäroiden infolge der Anwesenheit von A818-6.

Zu 2.4 (Abbildung 19) und 2.5 (nicht dargestellt)

Es wurde bereits eine stimulierende Wirkung von Fibroblasten auf den A818-6-Differenzierungsvorgang in unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Für dieses Experiment wurden die transduzierten A818-4-Zellen zum einen als bereits fertige Sphäroide auf einen konfluenten KIF-5-„monolayer“-Rasen ausgesät (**Abbildung 19**) und zum anderen wurden die Zellen zu gleichen Teilen

mit EGFP-transduzierten KIF-5-Fibroblasten gemischt und unter 3D-Bedingungen kultiviert (nicht gezeigt), wie schon unter Punkt 2.2 und 2.3 beschrieben.

Das Ergebnis der Kokultur-Experimente fiel in allen Fällen gleich aus: Weder die KIF-5-Fibroblasten noch die A818-6-Zellen hatten auf den Phänotyp der A818-4-Zellen einen augenscheinlichen Einfluss. Die auf dem KIF-5-Fibroblasten- bzw. A818-6-„monolayer“-Rasen ausgesäten A818-4-Sphäroide adhärten wie gewohnt nach bereits einem Tag und wuchsen schließlich wieder als „monolayer“. Als Positiv-Kontrolle wurden KIF-5-Fibroblasten mit A818-6WT Zellen kokultiviert, was auch wie erwartet zu größeren „hollow spheres“ führte.

3.1.4.4. Kokultivierung der Epimorphin-transduzierten A818-6-Zellen

Die durchgeführten Kokultur-Experimente im Überblick:

Zell/Zell-Kontakt: A818-6-Transduktanten ...

1. untereinander (z.B.: A818-6 EpiI mit A818-6 EpiII usw.) (nicht gezeigt)
2. auf KIF-5-ML (nicht gezeigt)
3. mit KIF-5 EGFP (nicht gezeigt)

Wie bereits für A818-4 beschrieben, wurden auch die verschiedenen A818-6-Transduktanten zum einen untereinander und zum anderen mit KIF-5-Fibroblasten kokultiviert (nicht gezeigt).

Allerdings bewirkte die Überexpression einer Epimorphin-Isoform weder eine Veränderung der „hollow sphere“-Morphologie noch konnte eine stimulierende Wirkung nachgewiesen werden.

3.1.5. Untersuchungen zur Zellproliferation in Abhängigkeit von Epimorphin

3.1.5.1. Expression Zellzyklus-abhängiger Proteine in Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen

In A818-6-„hollow spheres“ konnte in vorherigen Untersuchungen eine Proliferationsabnahme mit einer Abnahme der Expression des Zellzyklus-Promotors Cyclin B und einer Zunahme des Zellzyklus-Inhibitors p27^{KIP} gezeigt werden. Ob Epimorphin hier regulierend einwirkt, wurde mittels Westernblot analysiert (**Abbildung 20**). Die Cyclin B-Expression blieb in den Epimorphin I überexprimierenden A818-6-Zellen unverändert, während bei A818-6EpiII und EpiIII eine leichte Abnahme ermittelt wurde. In Epimorphin-Isoform II transduzierten A818-6-Zellen stieg dagegen die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p27^{KIP} um 27 %. Die Expression eines weiteren Zellzyklus-Inhibitors, p21^{WAF1/CIP1}, nahm in Epimorphin-Isoform II und III überexprimierenden A818-6-Zellen zu. Cyclin B und p27^{KIP} wurde ebenso in den überexprimierenden A818-4-Zellen analysiert und ergab ein vergleichbares Bild (nicht gezeigt).

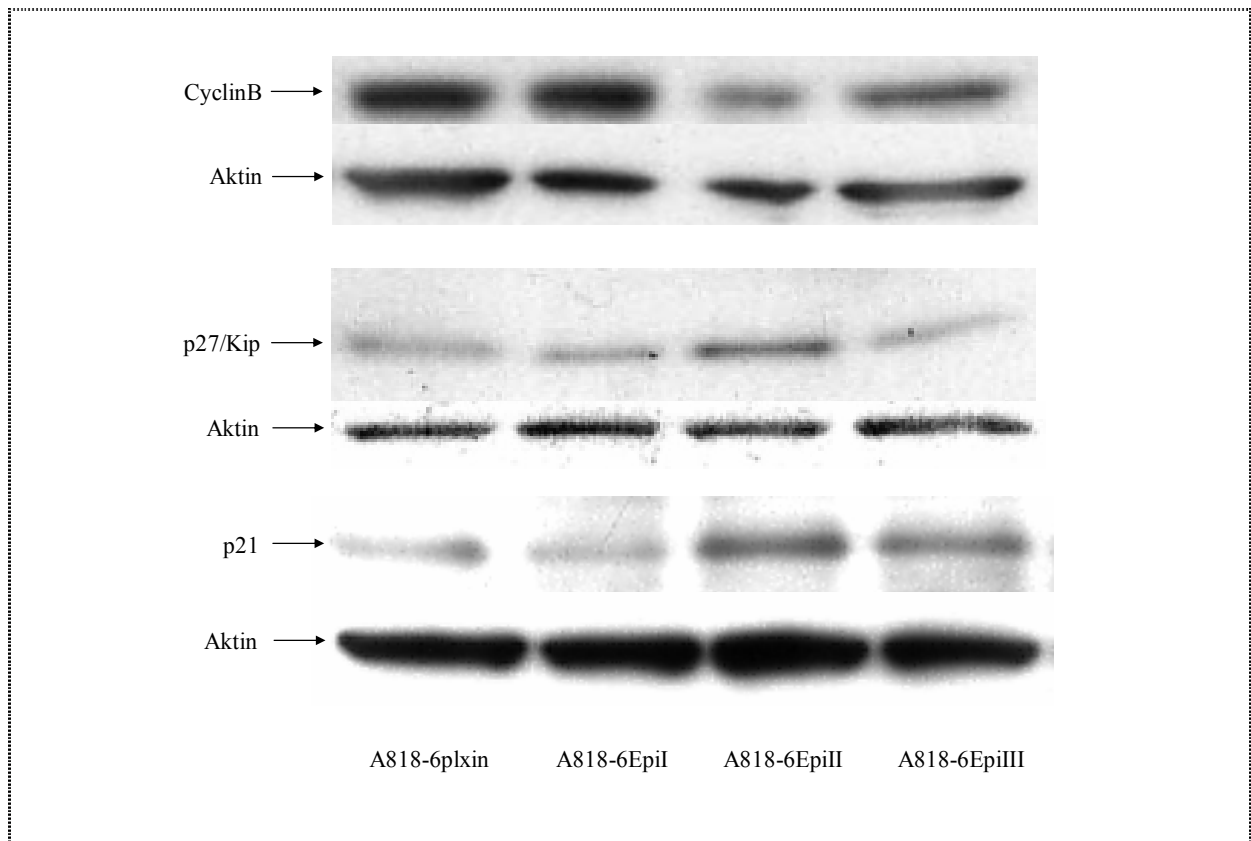


Abbildung 20: Westernblot-Analyse von Zellzyklus-relevanten Proteinen. Dieses Bild ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

3.1.5.2. Nachweis der Erk- und p38-Aktivierung

Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass A818-6-Zellen, die in der „hollow sphere“-Struktur vorliegen, eine geringe Proliferation, verbunden mit einer Abnahme der Telomeraseaktivität, aufweisen. Untersuchungen des MAP-Kinase-Signalwegs in den „hollow spheres“ zeigten im Vergleich zum korrespondierenden „monolayer“ eine Dephosphorylierung von Raf und Erk, trotz konstitutiv aktivem Ras (Ki-Ras-Mutation), die letztlich zu einer Abnahme der c-Myc Expression führte (Diplomarbeit Julia von Bötticher). Das heißt, es müssen alternative Signalwege, die erst auf der Ebene von Raf eingreifen, regulierend auf den MAP-Kinase-Signalweg einwirken. Um zu untersuchen, ob Epimorphin einen regulierenden Einfluss auf diesen Signalweg ausübt, wurden sowohl die Erk-Phosphorylierung als auch die p38-Aktivierung in den transduzierten A818-6-Zellen mittels Westernblot detektiert (**Abbildung 21**). In den Epimorphin-Isoform I überexprimierenden A818-6-Zellen war sowohl eine Aktivitätsabnahme von Erk 1/2 als auch von p38 zu erkennen. A818-6-Zellen, die mit der Isoform III ausgestattet waren, zeigten dagegen eine gesteigerte Erk 1/2-Phosphorylierung bei gleichbleibender p38-Aktivität. Epimorphin-Isoform II transduzierte A818-6-Zellen wiesen ein vergleichbares Aktivierungsmuster wie die Leervektor-Kontrolle (A818-6 plxin) auf.

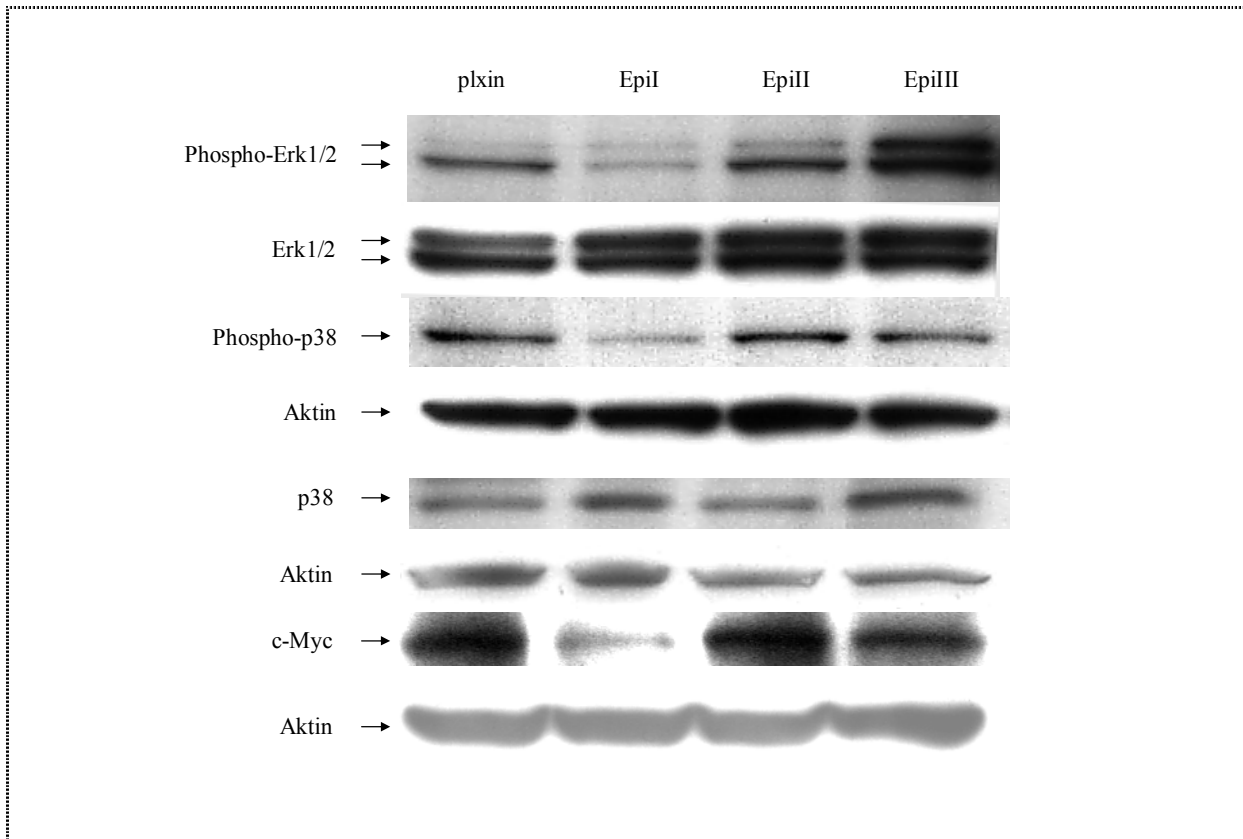


Abbildung 21: Westernblot zur Detektion von Phospho-p38, Phospho-Erk1/2 und c-Myc in Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen. Dieses Bild ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

3.1.5.3. Proliferation

Welchen Einfluss Epimorphin auf die Proliferation nimmt, ist offenbar zelltypabhängig, denn sowohl gar keine (Fritsch et al., 2002) als auch eine proliferationshemmende (Hirai et al., 1998); (Oka und Hirai, 1996) Wirkung von Epimorphin wurde bisher nachgewiesen, wobei jedoch nie zwischen den verschiedenen Epimorphin-Isoformen differenziert wurde.

Ein Viabilitätsassay mit A818-6WT-Zellen, die für drei Tage mit konditioniertem, FCS-freiem Medium inkubiert wurden, sollte Aufschluss darüber liefern, ob lösliches bzw. sezerniertes Epimorphin im Mediumüberstand einen Einfluss auf die Proliferation der A818-6WT-Zellen ausübt (**Abbildung 22**). Jedoch konnte keine Wirkung von löslichem Epimorphin auf die Proliferation von A818-6 WT-Zellen nachgewiesen werden.

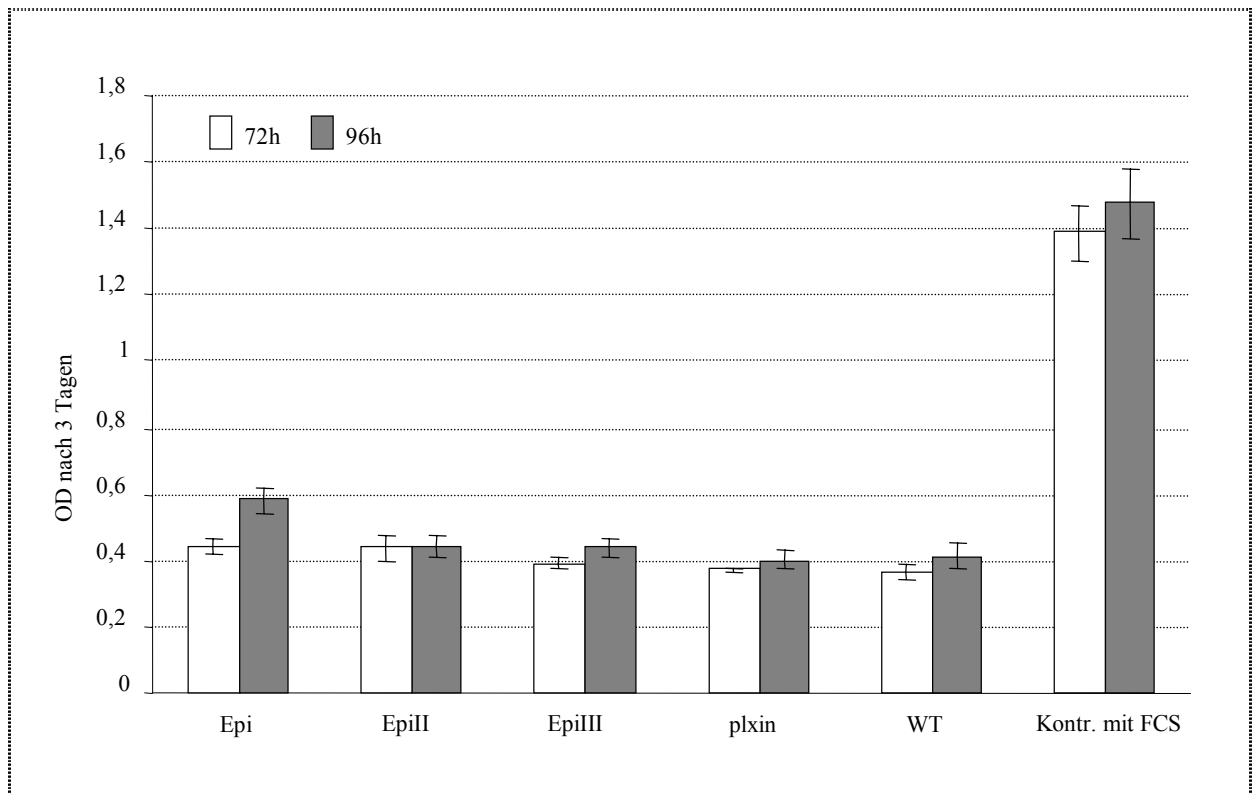


Abbildung 22: Viabilitätsmessung von A818-6 WT-Zellen nach drei-tägiger Inkubation mit verschiedenen Medium-Überständen. Die FCS-freien Medien wurden zuvor für 72 h und 96 h auf Epimorphin-überexprimierenden A818-6-“monolayer“-Zelle konditioniert. Viabilitätssay (EZ4U). Der Mittelwert wurde aus 8-12 Wiederholungen ermittelt. Diese Abbildung ist repräsentativ für zwei Experimente.

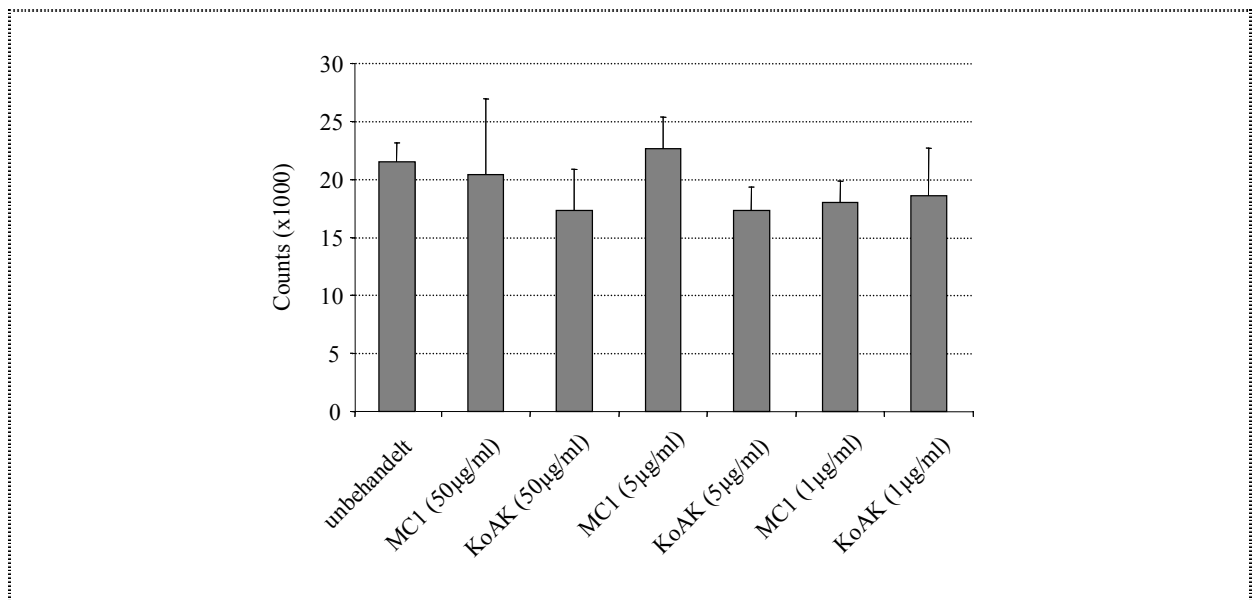


Abbildung 23: 3H-Thymidin-Inkorporation nach Behandlung von A818-6 mit dem neutralisierenden Epimorphin-Antikörper IgG. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Im umgekehrten Fall sollte die Proliferation der A818-6WT-Zellen untersucht werden, wenn Epimorphin durch die Zugabe des monoklonalen Epimorphin-Antikörpers (MC-1) neutralisiert wird

(**Abbildung 23**). Es wurden drei Konzentrationen des MC-1 und eines Kontroll-Ak eingesetzt. Die Proliferation wurde anhand der 3H-Thymidin-Inkorporations-Methode analysiert. Es ergab sich kein Einfluss auf die Proliferation infolge des neutralisierenden Epimorphin-Antikörpers.

3.1.5.4. Zellzyklus-Analysen

Zur Bestimmung der Zellzyklus-Verteilung wurde eine Propidiumjodid-Färbung mit anschließender Durchflusszytometrie durchgeführt (**Abbildung 24**).

Die Zellen wurden für den Versuch in gleicher Zelldichte ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Zellen nochmals für 18 h ohne FCS kultiviert wurden. Während die Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen eine leichte Erhöhung des G1-Anteils aufwiesen, war bei den A818-6-Zellen eine erhöhte Apoptoserate in Abhängigkeit von Epimorphin zu verzeichnen.

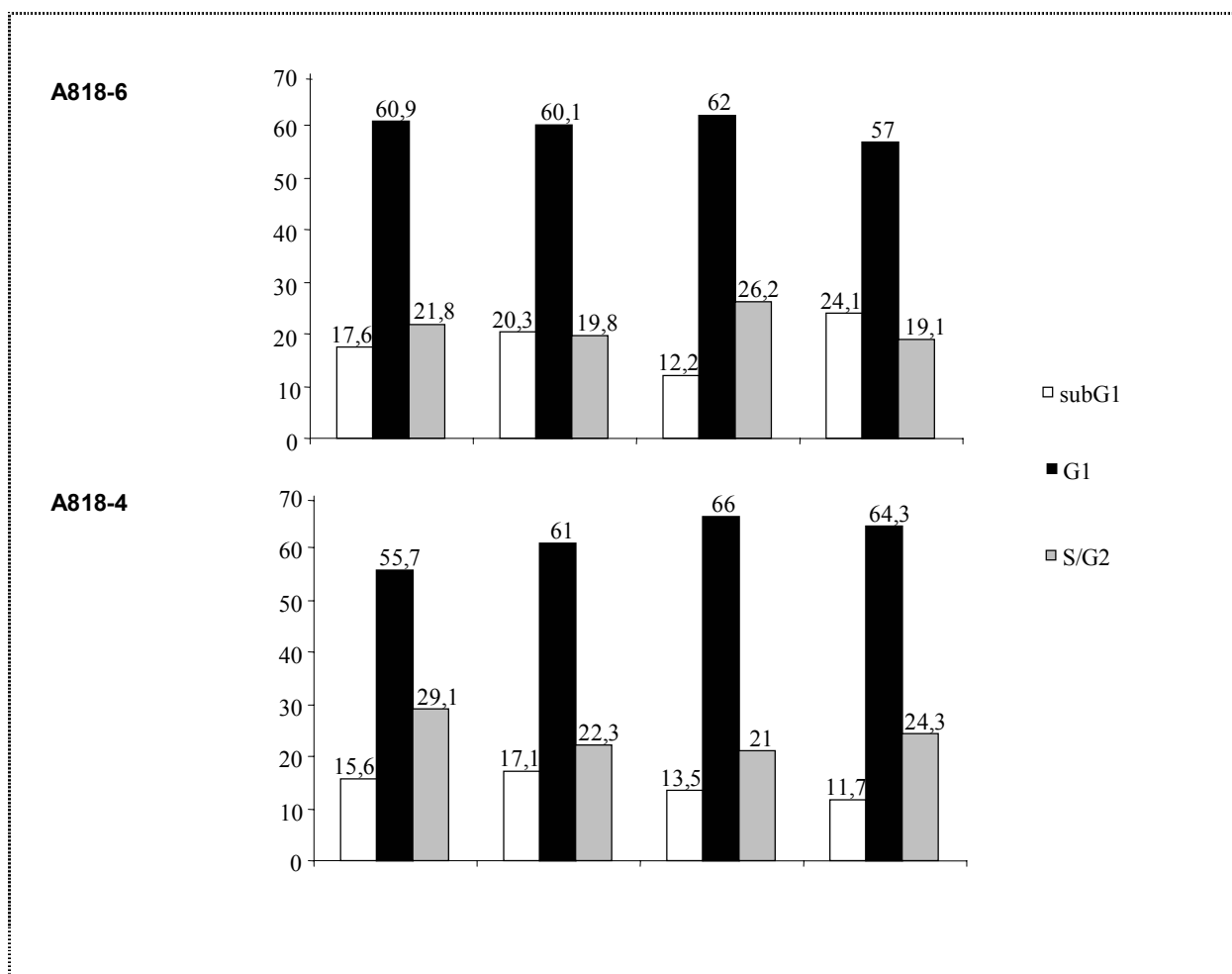


Abbildung 24: Auswertung der Zellzyklus-Analyse mittels Propidiumjodid-Färbung. Epimorphin-überexprimierende A818-6 und A818-4 „monolayer“-Zellen, die für 18 h ohne FCS kultiviert wurden. Analyse mittels Durchflusszytometrie. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

3.1.6. Telomeraseaktivität in Abhängigkeit von Epimorphin

Die Telomeraseaktivität nimmt in den A818-6-„hollow spheres“ im Vergleich zum korrespondierenden „monolayer“ um das sechsfache ab und korreliert in der Regel mit dem Differenzierungsstatus der Zellen.

Die Telomeraseaktivität in den Epimorphin-überexprimierenden „monolayer“-Zellen wurde mit Hilfe des TRAP-Assays ermittelt, der von Dr. W. Klapper aus der Pathologie in Kiel durchgeführt wurde. Die Epimorphin-Überexpression hatte in beiden Zelllinien eine Abnahme der Telomeraseaktivität bis zu 35 % zur Folge (**Abbildung 25**).

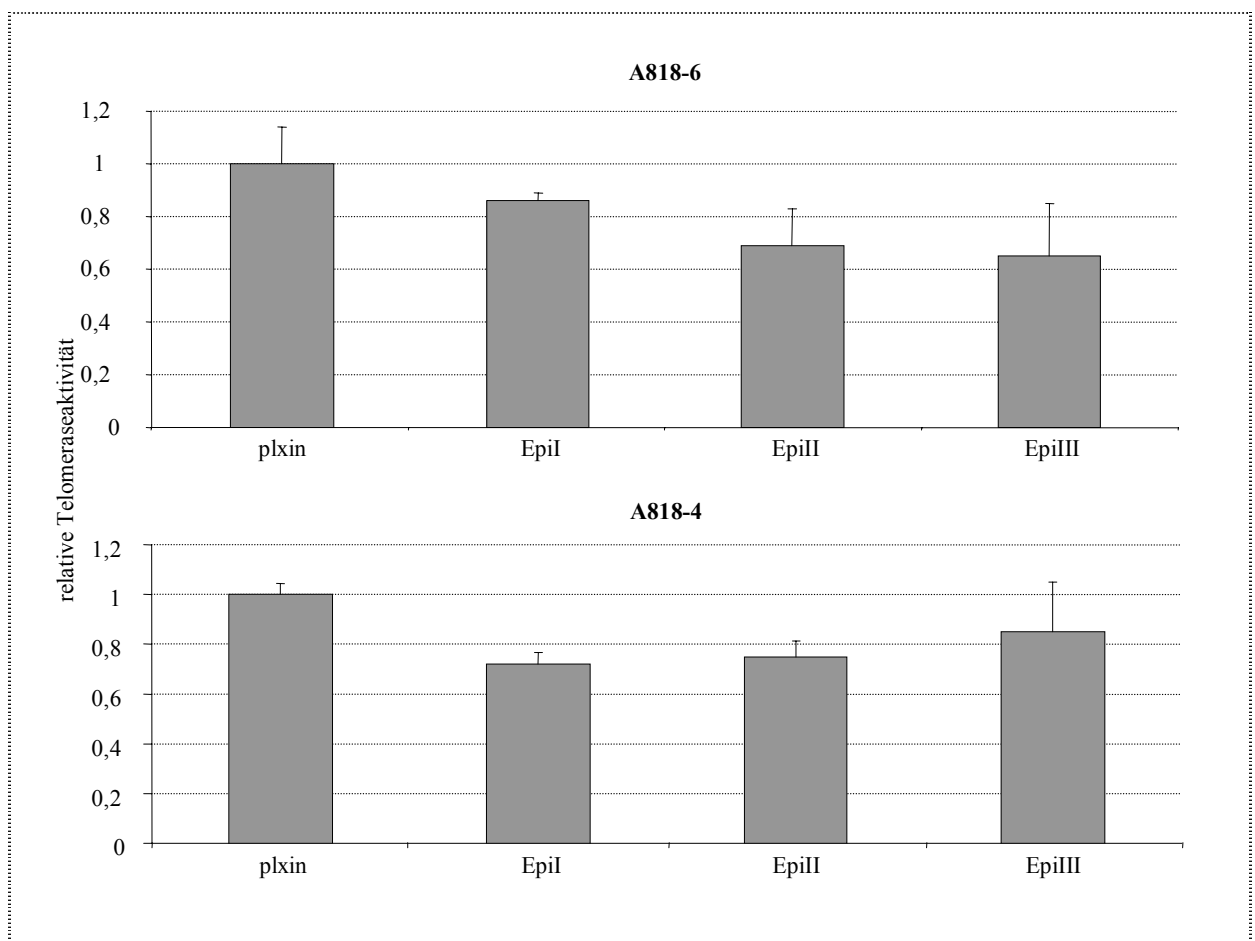


Abbildung 25: TRAP-Assay zur Bestimmung der relativen Telomeraseaktivität in den transduzierten A818-4- und A818-6-„monolayer“-Zellen. Mittelwert aus drei Wiederholungen erstellt. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei Experimente.

3.1.7. Apoptose in Abhängigkeit von Epimorphin

3.1.7.1. Apoptosesensitivität gegenüber CH11 (Anti-CD95)

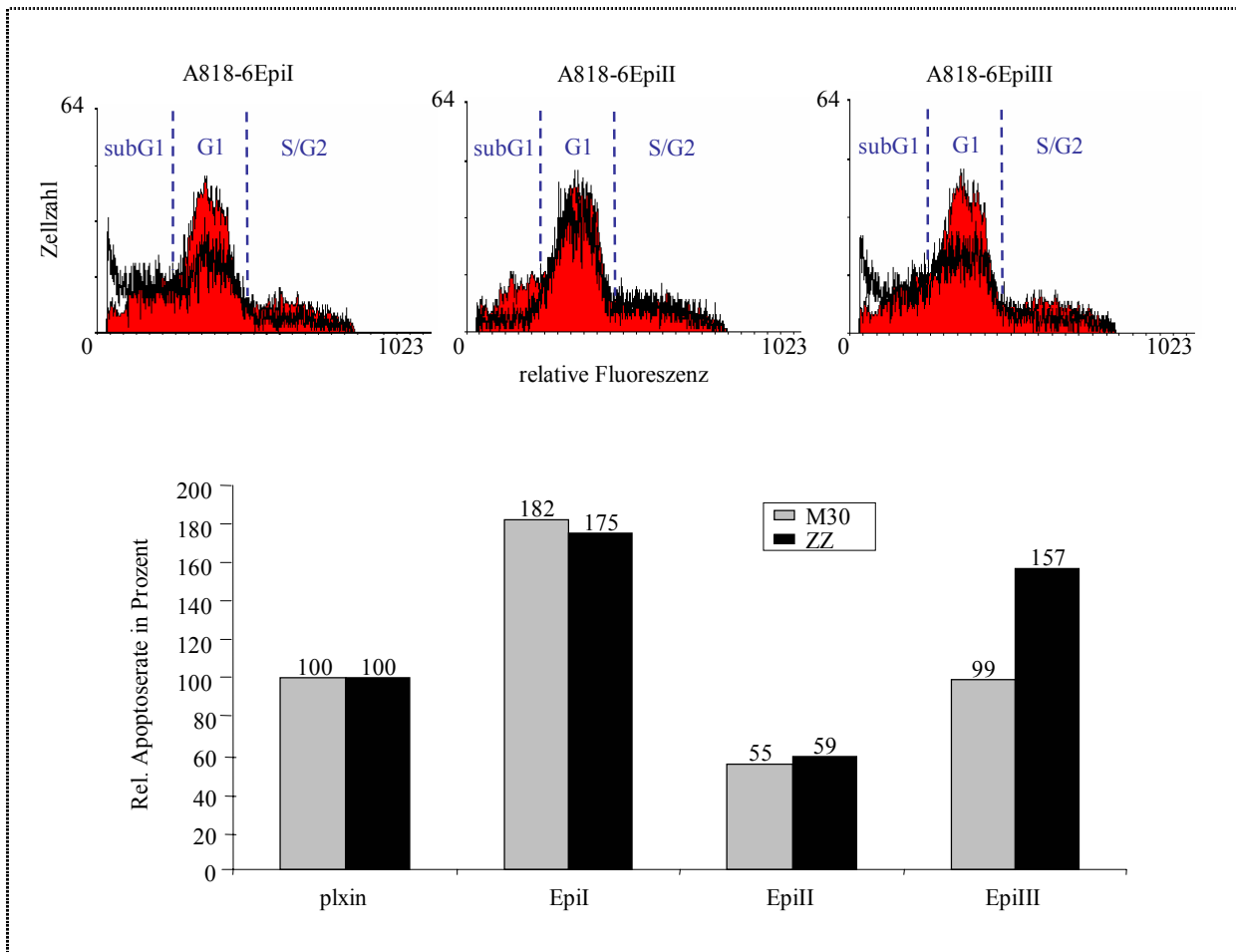


Abbildung 26: Bestimmung der Apoptosesensitivität. Oben: Rohdaten der Zellzyklus-Analysen nach CH11-Induktion (50 ng/ml) für 18 Stunden in Abwesenheit von FCS. Die rot-unterlegte Kurve stellt den entsprechenden Referenzwert dar (A818-6plxin). Die überlappende Kurve (schwarze Linie) stellt die entsprechende Transduktante dar. Unten: Gegenüberstellung der Apoptoseraten, erhalten aus der Zellzyklus-Analyse und der M30-Färbung. Die Zellen wurden in Abwesenheit von FCS für 18 h mit 50 ng/ml CH11 inkubiert. M30-Färbung der Zellen wurde nur einmal durchgeführt. Ansonsten ist diese Abbildung repräsentativ für drei Experimente.

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Apoptosesensitivität gegenüber CH11-Behandlung in Abhängigkeit von Epimorphin verhält. Dazu wurden die Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen in gleicher Zelldichte ausgesät und unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert bevor die Zugabe von 50 ng/ml CH11 erfolgte. Nach 18stündiger Inkubationszeit wurde entweder eine Propidiumjodid- oder eine M30-Färbung durchgeführt (**Abbildung 26**). Die Analyse erfolgte schließlich im Durchflusszytometer. Für die Auswertung der Daten wurden die Apoptoseraten der Levektorkontrolle (A818-6plxin) auf 100 % gesetzt und die Werte der Epimorphin-

überexprimierenden A818-6-Zellen zur Leervektorkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung der Daten, die aus den beiden unabhängig voneinander durchgeführten Methoden zur Apoptosedetektion (Propidiumjodid-Färbung und M30-Färbung) hervorgingen, wurden in einem Balkendiagramm gegenübergestellt. Dabei wurde generell eine deutliche Übereinstimmung dieser Daten offensichtlich, die eine Erhöhung der Apoptosesensitivität von Epimorphin I und III-überexprimierenden A818-6-Zellen zeigten. Epimorphin II-überexprimierende A818-6-Zellen reagierten gegenüber CH11-Behandlung resistenter als die Leervektorkontrolle. Es konnte eine Zunahme der Apoptosesensitivität bei A818-6EpiI um ca. 80 % und eine Abnahme der Apoptosesensitivität bei A818-6EpiII um ca. 45 % erreicht werden.

In Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen konnte hingegen keine reproduzierbare Änderung in deren Apoptosesensitivität festgestellt werden (nicht gezeigt).

3.1.7.2. Expression Apoptose-relevanter Proteine

Nachweis der CD95-Expression und Bestimmung der LIP/LAP-Ratio

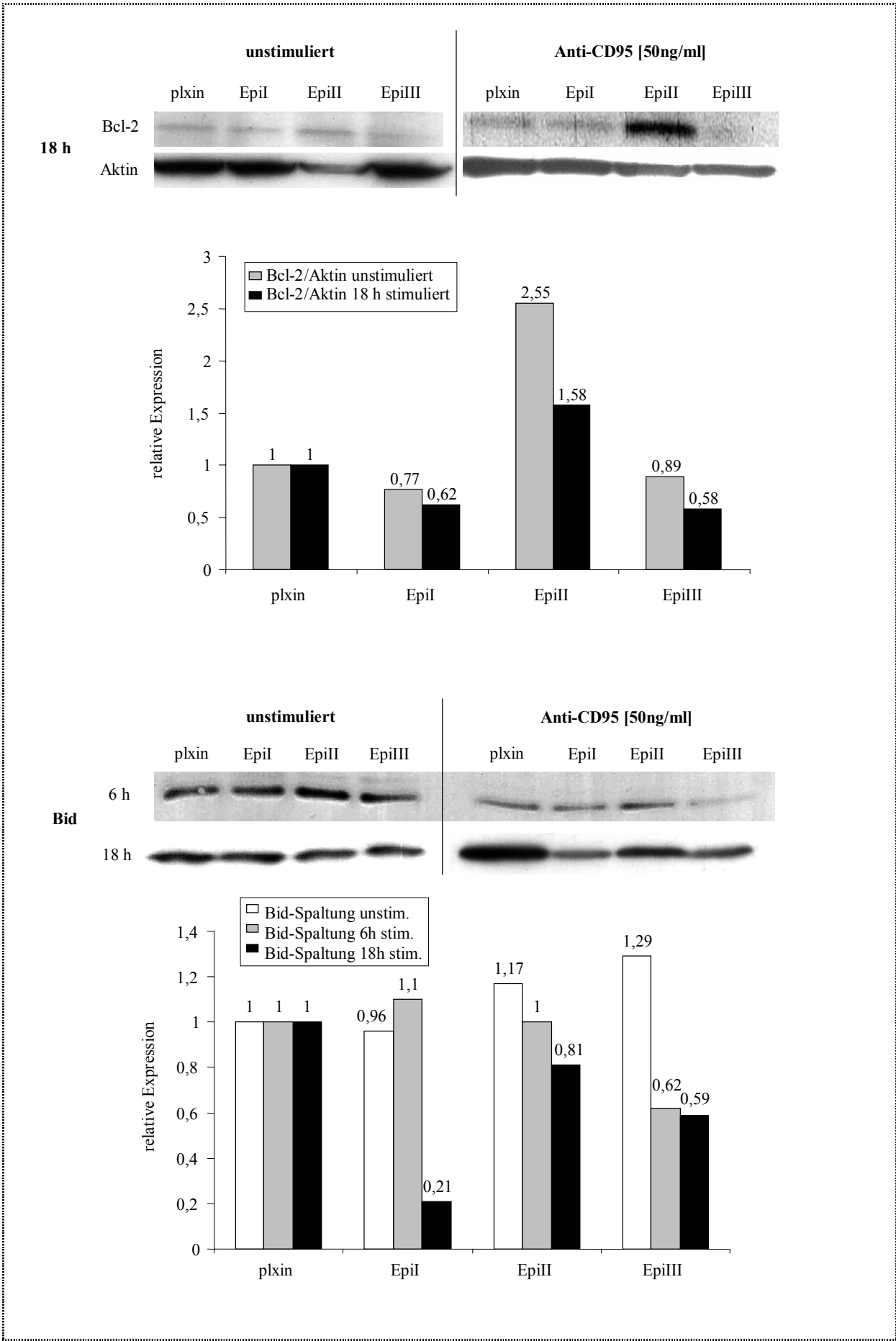
Im Folgenden wurde untersucht, ob die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Anti-CD95-Induktion mit einer veränderten Expression des Fas-Rezeptors (CD95) infolge der Epimorphin-Überexpression einhergeht. Dazu wurde eine Zelloberflächenfärbung der Zellen mit Anti-CD95 durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Ergebnis zeigte keine bedeutsame Veränderung in der CD-95-Expression (nicht dargestellt).

Weiterhin wurde überprüft, ob es infolge der Epimorphin-Überexpression zu einer veränderten LIP/LAP-Ratio kommt (vgl. Kapitel 1.6). Hirai beschrieb eine C/EBP-beta-vermittelte Modulation der Apoptose durch Epimorphin in Brustepithelzellen, indem Epimorphin die relativen Expression von LIP zu LAP erhöhte (Hirai et al., 2001).

Westernblot-Analysen offenbarten keine Änderung in der Expression von LIP oder LAP in Epimorphin-überexprimierenden Zellen (nicht gezeigt).

Detektion von Bcl-2, BclxL und Bid in Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen

Die hier nachgewiesenen Proteine gehören zur Bcl-2-Familie. Es wird zwischen pro- (z.B. Bid) und antiapoptotischen Proteinen (z.B. Bcl2, Bcl-xLong) unterschieden. Sie kontrollieren die mitochondriale Integrität und die Freisetzung Apoptose-assoziiierter Moleküle. Das proapoptotische Protein Bid liegt zytosolisch vor und wird nach einem Apoptose-Signal proteolytisch gespalten. Die Detektion dieser Proteine erfolgte sowohl in unbehandelten als auch mit Anti-CD95-behandelten Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen (**Abbildung 27**).



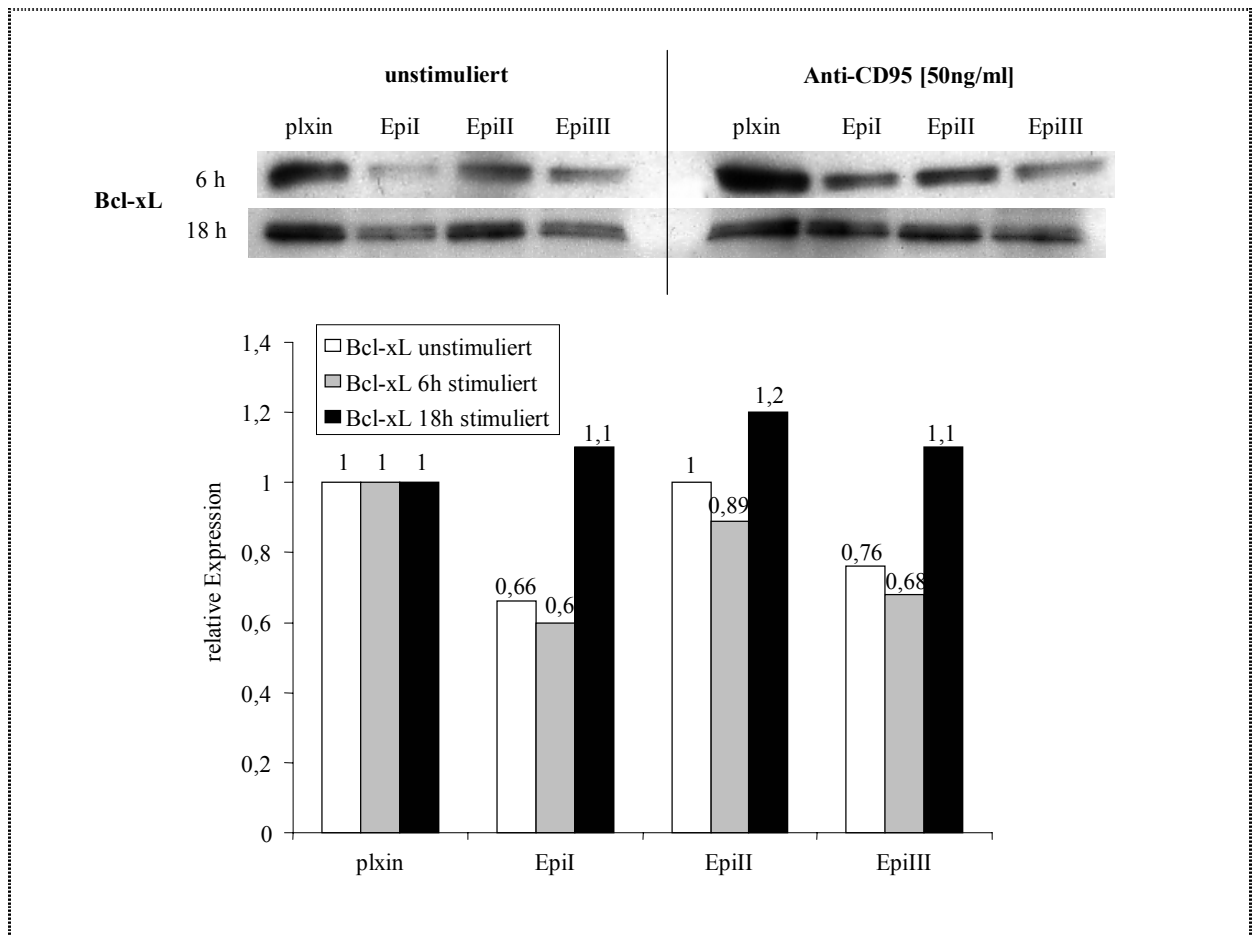


Abbildung 27: Densitometrische Auswertung der Westernblot-Analysen von pro- und antiapoptotischen Proteinen vor und nach Induktion mit 50 ng/ml CH11 (Anti-CD95). Für die Detektion von Bcl-xL und Bid wurden 40 µg Protein eingesetzt.

Die Epimorphin Isoform I und III-Überexpression führte zu einer gesteigerten Apoptosesensitivität, die ihren höchsten Wert in Abwesenheit von FCS und nach 18-stündiger Inkubation mit Anti-CD95 erreichte (ca. 70 % bei A818-6EpiI). Im Gegensatz dazu verhielten sich die A818-6EpiII-Zellen nach Anti-CD95-Induktion resistenter als die Leervektorkontrolle (ca. 40%). Die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL war entsprechend der Apoptosesensitivität in den Epimorphin Isoform I und Isoform III-überexprimierenden A818-6-Zellen reduziert. Ein weiteres antiapoptotisches Protein, Bcl-2, wurde stärker in Epimorphin Isoform II-überexprimierenden Zellen exprimiert. Die Bid-Spaltung war in unbehandelten Zellen unverändert. Nach 18stündiger Induktion mit Anti-CD95 konnte dann aber eine deutlich gesteigerte Spaltung nachgewiesen werden, die entsprechend der Apoptosedaten in Epimorphin Isoform I- und III-überexprimierende Zellen am stärksten ausfiel.

3.1.8. Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in Abhängigkeit von Epimorphin in A818-4 und A818-6-Zellen mittels Microarray-Analysen

Für diesen Zweck wurde ein Microarray eingesetzt, der 527 Gene, die an Differenzierungs- und Regenerations-Vorgängen der Zelle beteiligt sind, abdeckt. Durchgeführt wurde der Array von der „Mucosa“-Forschungsgruppe aus der 1.Medizinischen Klinik in Kiel unter der Leitung von Dr. R. Häslar (www.mucos.de/microarrays/).

Die Epimorphin-überexprimierenden A818-4 und A818-6-Zellen wurden dazu mit der jeweiligen Leervektorkontrolle verglichen (A818-4plxin, A818-6plxin). Es stellte sich u. a. folgendes Gen als differentiell exprimiert heraus: „N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1“ (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Auswertung der Microarray-Analyse. Die Relative Transkriptionsänderung in den Epimorphin-überexprimierenden A818-4- und A818-6-Zellen vergleichend zur entsprechenden Leervektorkontrolle.

Gen	A818-4 EpiI	A818-4 EpiII	A818-4 EpiIII	A818-6 EpiI	A818-6 EpiII	A818-6 EpiIII
ASAHI	-1,35	-1,34	-1,38	-1,6	-1,07	1

3.1.8.1. Ceramid-Generation in Abhängigkeit von Epimorphin

Ceramid entsteht durch Hydrolyse von Sphingomyelin, einem Membranlipid. Ceramide können die Differenzierung induzieren und Apoptose einleiten. In einigen Publikationen wird eine Ceramid-vermittelte Wirkung von differenzierungsfördernden Substanzen, wie z.B. all-trans-Retinolsäure (Kravetka et al., 2003) oder 1,25-dihydroxyvitamin D (Pillai et al., 1999; Okazaki et al., 1990), beschrieben.

Der Ceramidgehalt einer Zelle kann einerseits über *de-novo*-Synthese und andererseits über die Sphingomyelin-Hydrolyse generiert werden. Aber auch durch Ceramidasen, die Ceramide weiter abbauen zu Sphingosin, kann der Ceramid-Anteil moduliert werden (siehe **Abbildung 31**).

Saure Ceramidase-Expression in Abhängigkeit von Epimorphin

Da aus der vorhergehenden Microarray-Analyse veränderte mRNA-Gehalte von Sauren Ceramidasen hervorgingen, wurden diese nochmals auf Proteinebene untersucht. In A818-6-Zellen wurde die Expression von Sauren Ceramidasen in Abhängigkeit von den Epimorphin-Isoformen verändert. Im Westernblot zeigte sich eine Reduktion der katalytisch aktiven Untereinheit saurer Ceramidasen in den Epimorphin-Isoform I und III-überexprimierenden A818-6-Zellen (**Abbildung 28**).

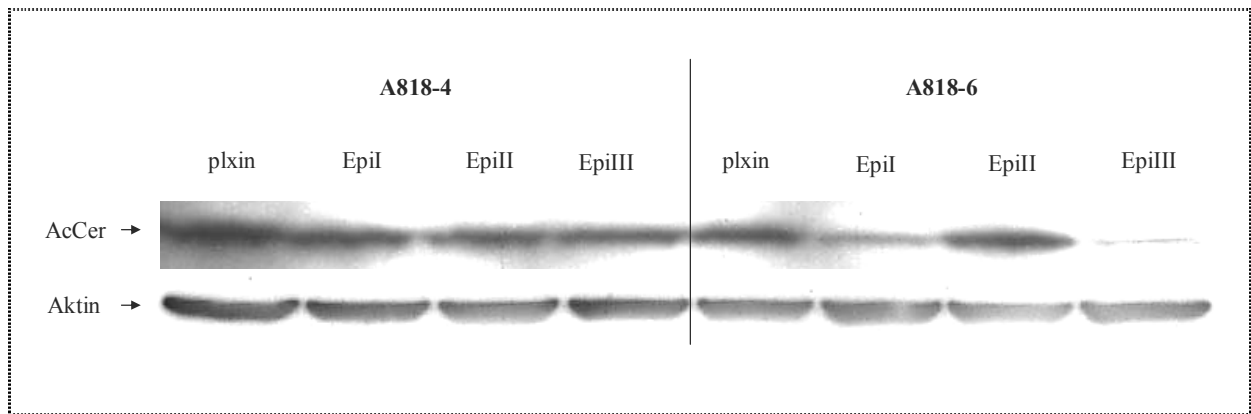


Abbildung 28: Westernblot-Analyse zur Detektion der sauren Ceramidase (AcCer) in Abhängigkeit von Epimorphin. Dieser Westernblot ist repräsentativ für drei Experimente.

Ceramidgehalt der Epimorphin-überexprimierenden A818-6 Monolayerzellen

Eine Abnahme der Sauren Ceramidasen lässt einen höheren Ceramid-Gehalt in der Zelle vermuten, wenn davon ausgegangen wird, dass die *de-novo*-Synthese und der Sphingomyelin-Abbau vergleichbar sind.

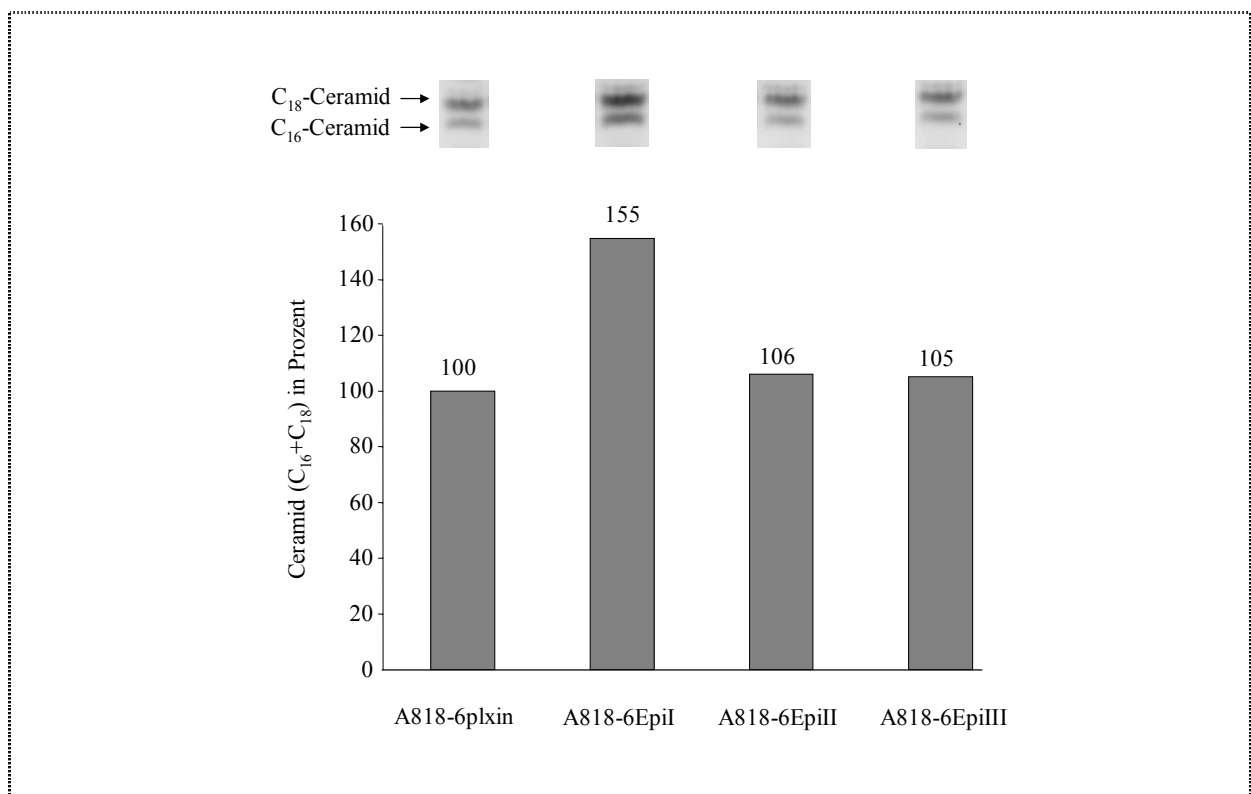


Abbildung 29: Quantifizierung von C₁₆- und C₁₈-Ceramiden mittels Dünnschichtchromatografie. Densitometrische Auswertung der Ceramid-Banden, durchgeführt von Dr. Winoto-Morbach (Immunologie, Kiel). Der Versuch wurde nur einmal durchgeführt.

Die Detektion von C₁₆- und C₁₈-Ceramiden in den A818-6-Transduktanten erfolgte mittels Dünnschichtchromatografie mit anschließender Veraschung, die im Institut für Immunologie (Kiel) unter Anleitung von Dr. Winoto-Morbach durchgeführt wurde (**Abbildung 29**). Im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (A818-6plxin) war der C₁₆- und C₁₈-Ceramid-Gehalt in den Epimorphin Isoform-I transduzierten A818-6-Zellen um 55 % erhöht. A818-6EpiIII zeigte jedoch wider Erwarten keine Änderung.

3.1.9. Die Rolle von Sphingolipiden bei der A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung

Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Epimorphin-beeinflussten Protein-Expressionen und deren Wirkung auf die „hollow sphere“-Bildung zu finden. Wie schon gezeigt, beeinflusst insbesondere Epimorphin Isoform I die Saure Ceramidase-Aktivität, nachgewiesen direkt im Westernblot und indirekt durch Quantifizierung des Ceramidgehalts.

Um der Antwort näher zu kommen, inwieweit saure Ceramidasen, die die Hydrolyse von Ceramiden katalysieren, eine Rolle in der „hollow sphere“-Entwicklung spielen, wurde zunächst die katalytisch aktive Untereinheit der sauren Ceramidase im Westernblot im Zeitverlauf der „hollow sphere“-Bildung nachgewiesen (**Abbildung 30**).

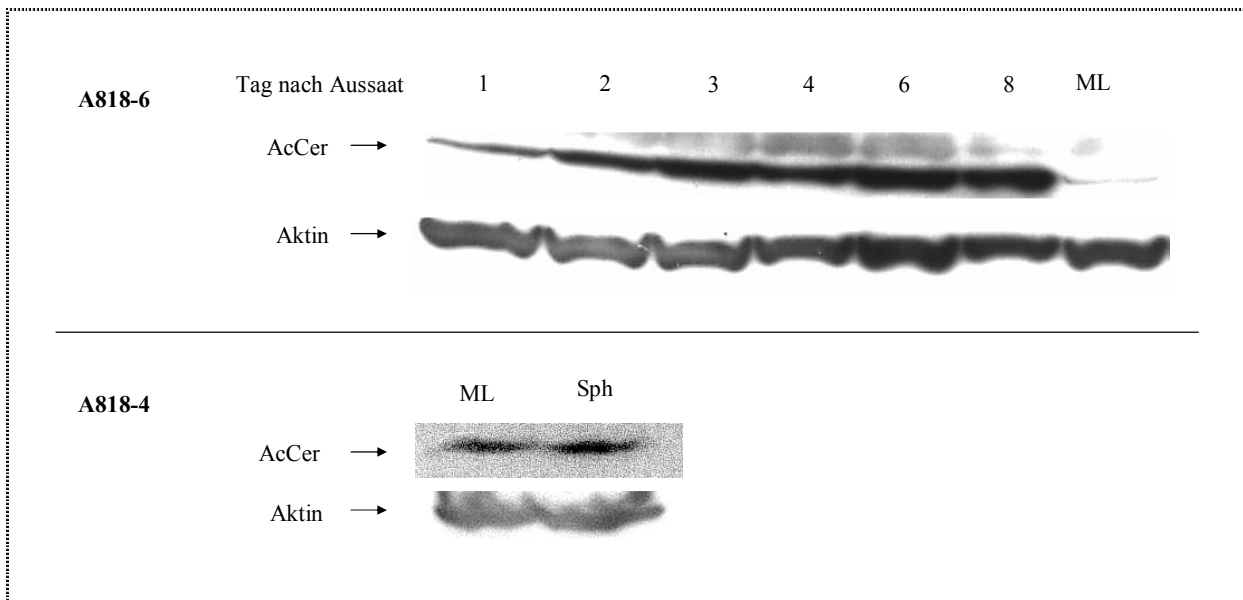


Abbildung 30: Westernblot zur Detektion von aktiven Sauren Ceramidasen im Zeitverlauf der A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung bzw. A818-4 „monolayer“ vs. Sphäroide. Das Bild ist repräsentativ für zwei Experimente.

Entgegen der Wirkung von Epimorphin Isoform I kam es während der „hollow sphere“ Entwicklung zu einer deutlichen Zunahme der katalytisch aktiven Untereinheit der sauren Ceramidase. Im Vergleich dazu wurde auch der Gehalt von Sauren Ceramidasen in A818-4 in Abhängigkeit von der Kultivierung getestet. Bei dieser Zelllinie zeigte sich jedoch keine Änderung (**Abbildung 30**).

3.1.9.1. Inhibierung der Ceramid-Generierung

Mit Hilfe von zwei pharmakologischen Inhibitoren sollte die Ceramid-Generierung inhibiert werden. Die Substanz Fumonisin B1 inhibiert die *de-novo* Synthese von Ceramiden, indem es die Sphingosin-N-Acyltransferase blockiert. Die zweite Substanz, Desipramin, wirkt auf den Sphingomyelin-Katabolismus und reduziert den Ceramid- Gehalt durch die Inhibierung der sauren Sphingomyelinasen und hemmt damit den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid.

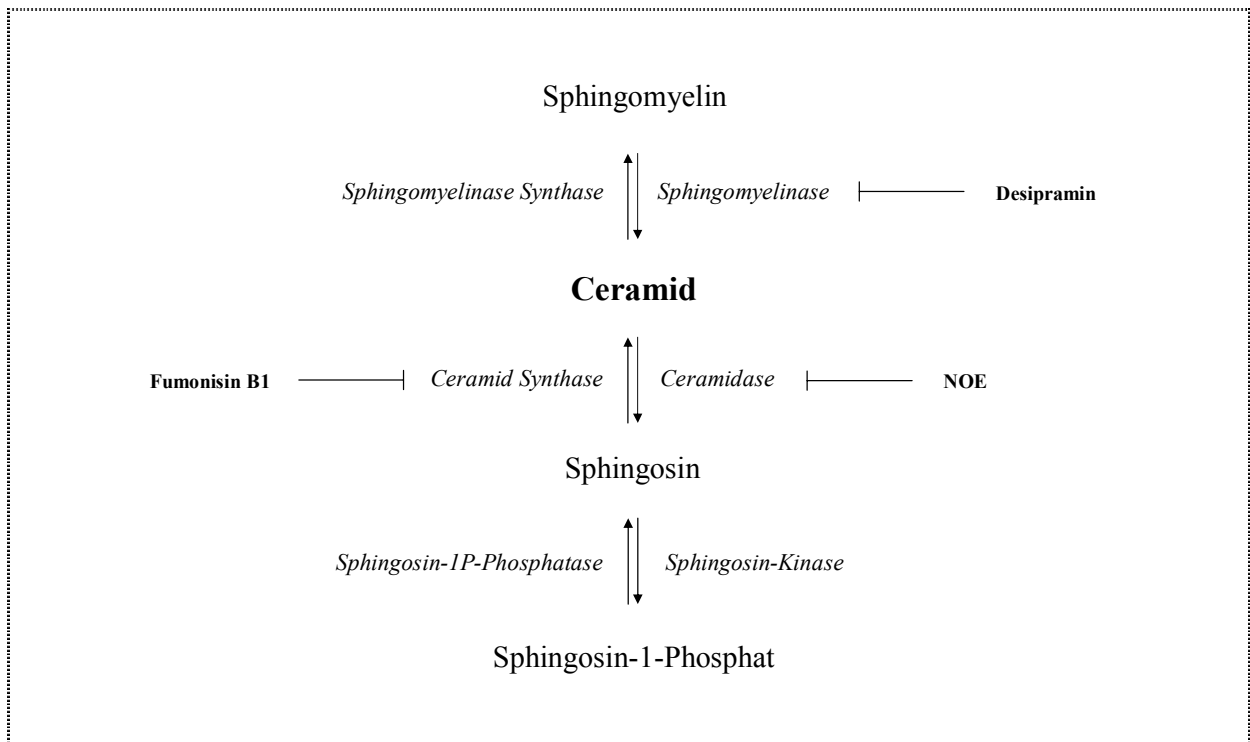


Abbildung 31: Vereinfachte Darstellung des Ceramid-Stoffwechsels und Angriffspunkte der verwendeten Inhibitoren.

In Anwesenheit von Fumonisin B1 wurde die „hollow sphere“-Entwicklung nicht beeinflusst (nicht gezeigt), dagegen konnte ein drastischer Effekt nach Behandlung mit Desipramin erzielt werden (**Abbildung 32**). Desipramin in einer Konzentration von 25 μ M führte zur Blockierung der Lumenbildung. Es entwickelten sich kompakte Sphäroide, die in ihrer Größe nahezu unverändert blieben (**Tabelle 3**), während im Laufe der Lumenbildung die Größe der „hollow spheres“ zumindest bis zur vollständigen Ausreifung zunimmt. Zwischen dem zweiten und vierten Tag der „hollow sphere“-Entwicklung kam es zu einer Größenzunahme von durchschnittlich ca. 30 – 40 %. Im

Gegensatz dazu wurde in Anwesenheit des Inhibitors eine Größenzunahme von lediglich ca. 12 % verzeichnet. Nach Absetzen des Inhibitors konnten die A818-6-Aggregate wieder ein Lumen ausbilden (nicht gezeigt).

Tabelle 3: Ausmessung der Durchmesser der A818-6-Zellaggregate bzw. „hollow spheres“ in An- und Abwesenheit von Desipramin. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Okularmikrometers vermessen. Es wurde der Durchschnitt aus je 20 gezählten Aggregaten ermittelt.

	2. Tag	4. Tag
Unbehandelt	128 +/- 36 μm	165 +/- 47 μm
Methanol	120 +/- 34 μm	170 +/- 49 μm
Desipramin	100 +/- 20 μm	112 +/- 31 μm

3.1.9.2. Inhibierung der Sauren Ceramidasen

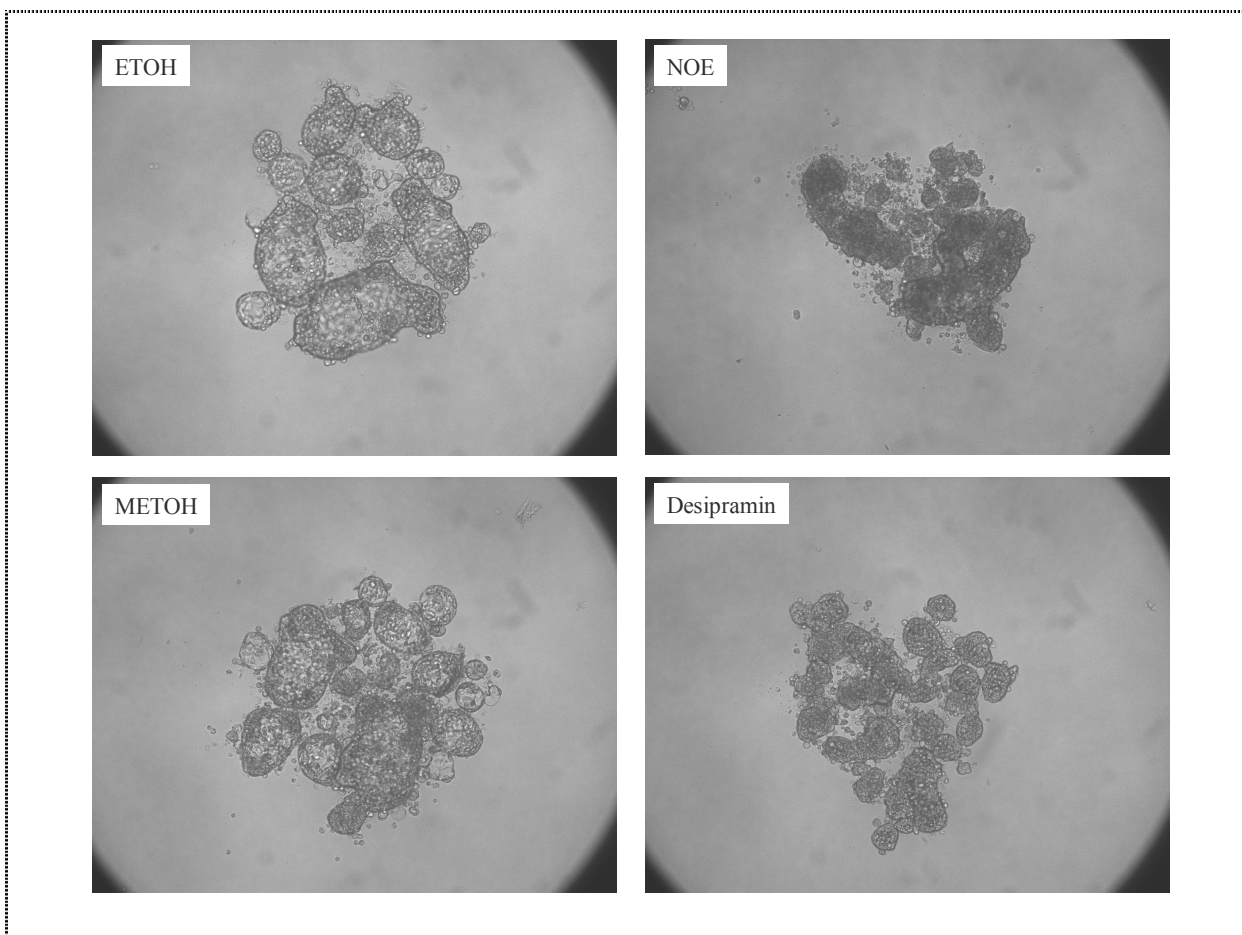


Abbildung 32: A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit des sauren Sphingomyelinase-Inhibitors Desipramin oder des Sauren Ceramidase-Inhibitors NOE. Die Inhibitorzugabe erfolgte direkt nach Zellaussaat. Die Kontrollen wurden mit den entsprechenden Lösungsmitteln durchgeführt. Die Aufnahmen wurden nach zwei Tagen angefertigt. 100fache Vergrößerung.

Als pharmakologischer Inhibitor für Saure Ceramidasen wurde N-Oleoylethanolamin (NOE) eingesetzt (Strelow et al., 2000). Die geeignete Konzentration wurde zunächst austitriert. Eine Konzentration von 100 μM NOE führte beim „monolayer“ zum Ablösen der Zellen. Setzte man den Inhibitor zu Beginn der 3D-Kultivierung ein, waren nach 24 h ebenfalls nur Einzelzellen zu finden. Bei reifen „hollow spheres“ hingegen übte diese Inhibitorkonzentration von 100 μM keinen Einfluss auf deren Integrität aus. Bei Konzentrationen bis 75 μM blieb der „monolayer“ noch intakt, jedoch waren vermehrt vesikuläre Strukturen in den Zellen zu erkennen (nicht gezeigt). Diese Inhibitorkonzentration (75 μM) führte in der 3D-Kultur zu einer deutlichen Abnahme der Lumenbildung und zur Bildung von kompakten Sphäroiden. Im Vergleich zum Inhibitor Desipramin war der Effekt von NOE auf die lichtmikroskopisch beurteilte Strukturbildung ähnlich (**Abbildung 32**).

3.1.10. Expression des Proteins pp60c-src in Epimorphin-überexprimierenden A818-4 und A818-6 „monolayer“-Zellen

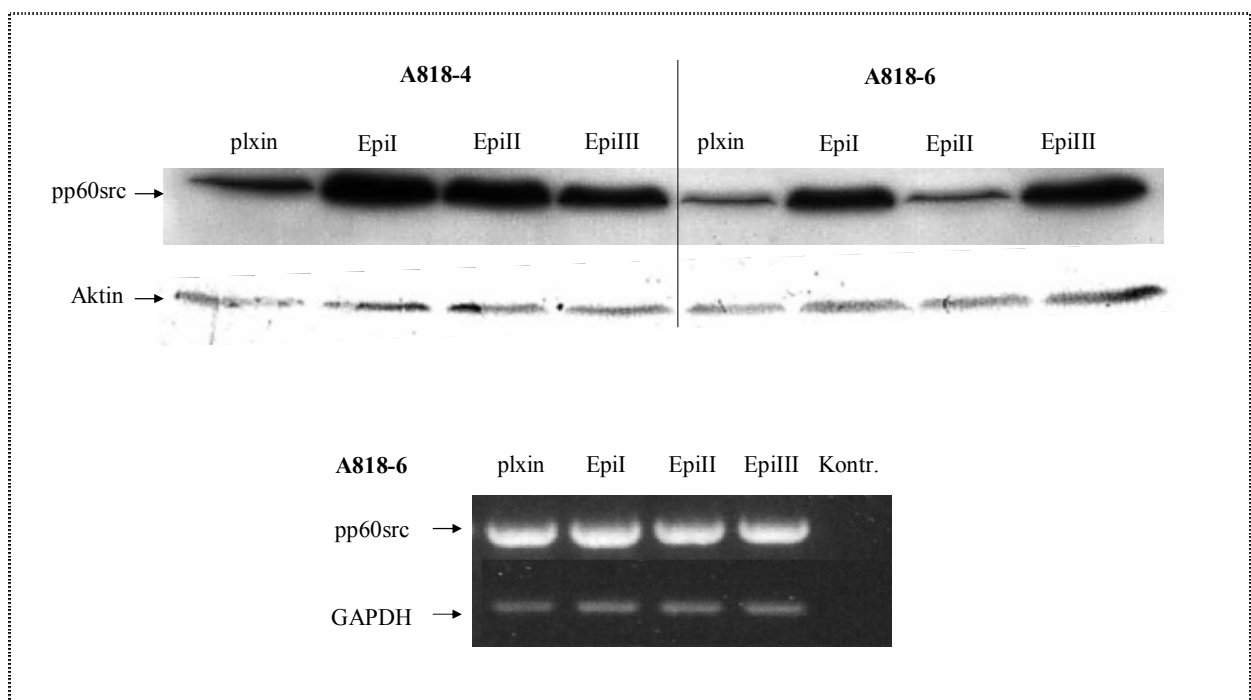


Abbildung 33: Westernblot- und RT-PCR-Analysen von pp60c-src in Epimorphin überexprimierenden A8184- und A818-6-Zellen. Der Westernblot ist repräsentativ für mindestens fünf Experimente. Die RT-PCR-Analyse ist repräsentativ für zwei Experimente.

Die Tyrosin-spezifische Proteinkinase pp60c-src transduziert die Signale von der Zellmembran ins Zellinnere und kann dabei viele intrazelluläre Signalwege stimulieren, was wiederum ganz

unterschiedliche zelluläre Konsequenzen, wie z. B. morphologische Veränderungen oder Zellproliferation, zur Folge haben kann. Dieses Protein schien deshalb interessant, weil es Parallelen zum Epimorphin aufweist, denn 1. kolokalisiert es mit Markern synaptischer Vesikel und 2. spielt das Protein eine Rolle in der Morphogenese und in Entwicklungsprozessen (z.B. Synaptogenese).

Die pp60c-src Expression war in den Epimorphin-transduzierten A818-4 und A818-6-Zellen deutlich höher (**Abbildung 33**). Interessanterweise war in den A818-6 EpiII Zellen keine Veränderung zu erkennen. Auf transkriptioneller Ebene konnte dagegen kein Unterschied festgestellt werden.

3.1.10.1. Kolokalisation von aktivem pp60c-src und Epimorphin

Im Folgenden wurde mittels Immunzytochemie die Verteilung von Epimorphin und pp60c-src in der Zelle untersucht. In der Leervektorkontrolle ist eine schwächere Färbung zu sehen, die Kolokalisation von Epimorphin und aktivem pp60c-src ist jedoch in der Leervektorkontrolle (A818-6plxin) als auch in den transduzierten Zellen (A818-6EpiI) deutlich erkennbar. Die gelbliche Färbung, entstehend aus der Überlappung von rot und grün, scheint vorwiegend in vesikulären Strukturen vorzuliegen (**Abbildung 34**).

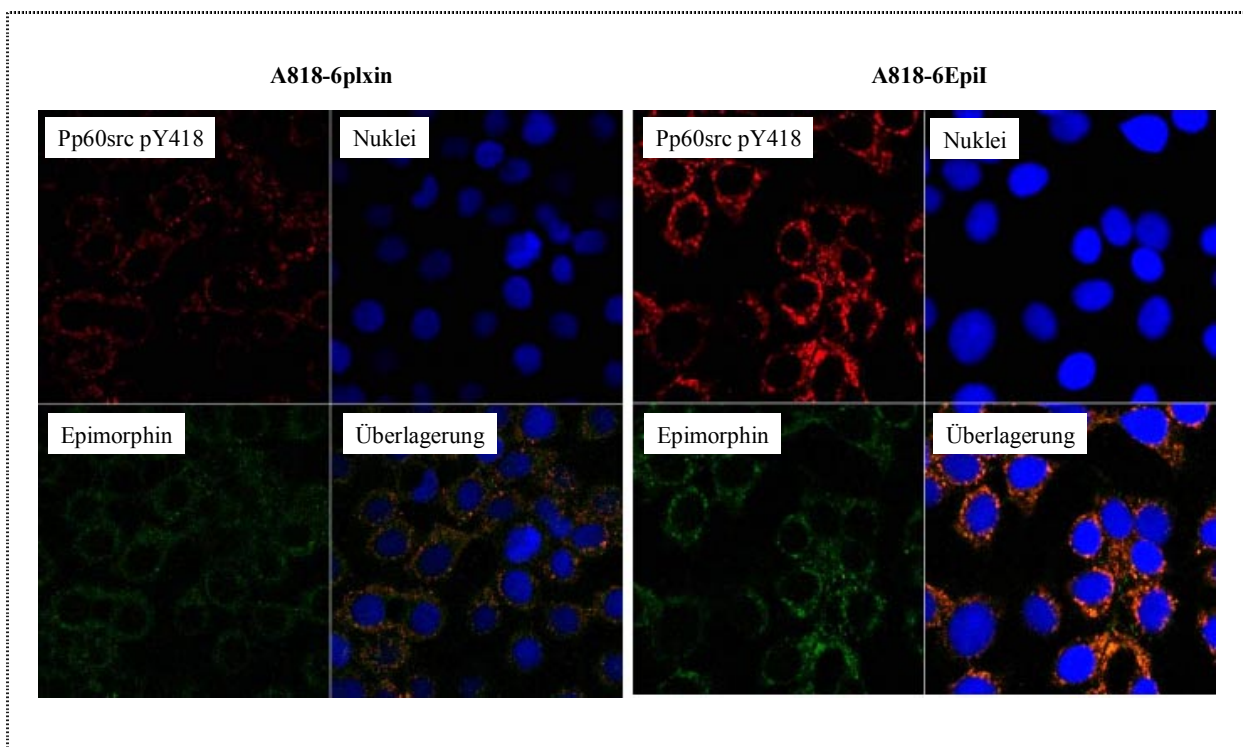


Abbildung 34: Immunzytochemie zum Nachweis von aktivem pp60c-src und Epimorphin. Kernfärbung erfolgte mit Höchst; aktives pp60c-src ist rot und Epimorphin ist grün dargestellt. Die Färbung wurde an „monolayer“-Zellen durchgeführt.

3.1.10.2. Kopräzipitation der Epimorphin-Isoform I und II mit pp60c-src

Aufschluss über eine mögliche Komplexbildung von Epimorphin und pp60c-src sollte eine Ko-Immunpräzipitation geben (**Abbildung 35**). Mit Hilfe eines monoklonalen Agarose-konjugierten Antikörpers gegen Gesamt-src erfolgte die Immunpräzipitation von pp60c-src. Mittels Westernblot konnte dann Epimorphin I und II in den pp60c-src-Komplexen detektiert werden, allerdings nur in den überexprimierenden A818-6-Zellen. Die kurze Isoform, Epimorphin III, konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

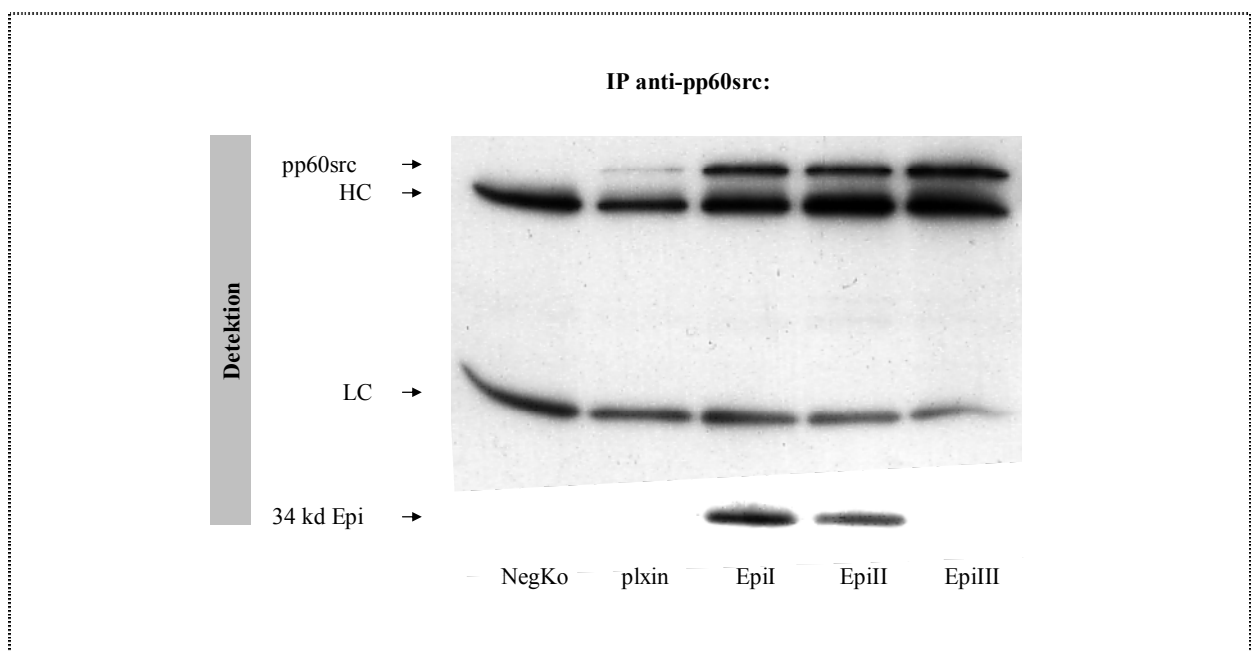


Abbildung 35: Ko-Immunpräzipitation von Epimorphin. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Anti-pp60c-src aus Epimorphin-überexprimierenden A818-6 „monolayer“-Zellen. Mittels Westernblot erfolgte der Nachweis von Epimorphin I und II in den Immunpräzipitaten. Abkürzung: HC = schwere Immunglobulinkette; LC = leichte Immunglobulinkette. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei Experimente.

3.1.10.3. Phosphorylierung von pp60c-src

Für die katalytische Aktivität von pp60c-src ist die Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin 418, lokalisiert in der katalytischen Domäne, erforderlich. Die Phosphorylierung des Tyrosins 529 verhindert dagegen die pp60c-src-Aktivierung.

Aus den Lysaten von Epimorphin-überexprimierenden A818-6 „monolayer“-Zellen wurde pp60c-src mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers präzipitiert. Die Detektion erfolgte schließlich mit einem Antikörper gegen Gesamt-Phospho-Tyrosin und Phospho-Tyrosin 529 in pp60c-src (**Abbildung 36**).

Wie zuvor schon nachgewiesen, lag pp60c-src in den Epimorphin-Isoform I und III-überexprimierenden A818-6-Zellen vermehrt vor. Entsprechend erhöht waren auch die phosphorylierten Formen von pp60c-src, sowohl die aktive (nicht gezeigt) als auch die inaktive Form. Um genauere Aussagen über die Aktivität von pp60c-src innerhalb der Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen liefern zu können, erfordert es die Durchführung eines Aktivitätsassays.

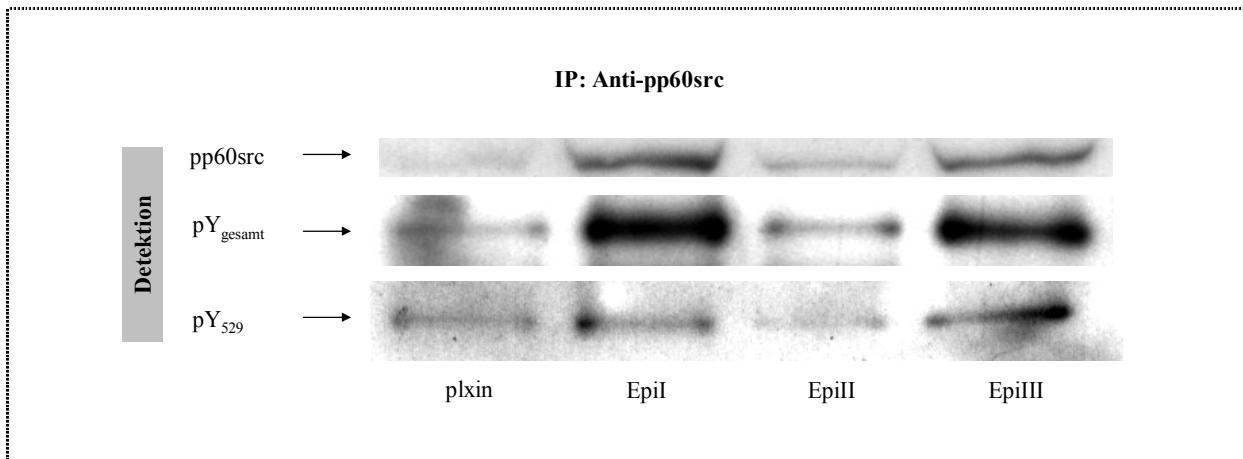


Abbildung 36: Phosphorylierung von Gesamt-Phospho-Tyrosin und Phospho-Tyrosin 529 in pp60c-src. Immunpräzipitation von pp60c-src aus Epimorphin-überexprimierenden A818-6 „monolayer“-Zellen und anschließende Western blot-Analyse zum Nachweis von phosphoryliertem pp60c-src. Die Abbildung ist repräsentativ für drei Experimente.

3.1.11. Die Rolle des aktiven pp60c-src in der A818-6-„hollow sphere“-

Bildung

Es wurde weiterhin untersucht, ob möglicherweise Epimorphin die „hollow sphere“-Entwicklung über die Regulation von pp60c-src beeinflusst. Dazu wurde zunächst der Proteingehalt von pp60c-src sowie dessen Tyrosin-Phosphorylierung an Position 418 im Western blot bestimmt. Es wurde in beiden Fällen keine Veränderung beobachtet (hier nicht gezeigt).

Behandelte man jedoch die A818-6-Zellen direkt nach Aussaat auf Agarose-beschichtete Zellkulturplatten mit dem pp60c-src-Inhibitor Herbimycin A, so war eine konzentrationsabhängige Verschlechterung der A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung deutlich zu sehen (**Abbildung 37**). Ähnlich wie bei Desipramin-behandelten Zellen war auch hier eine reduzierte Größe der A818-6-Aggregate offensichtlich zu verzeichnen.

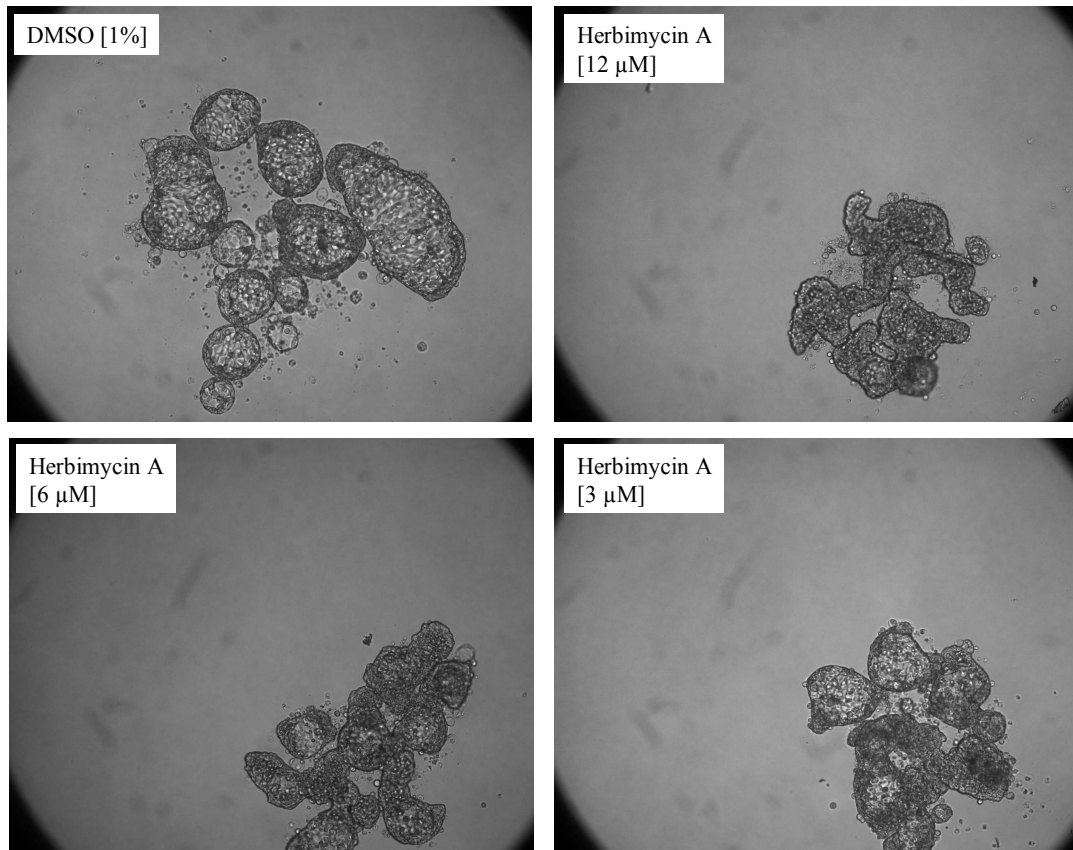


Abbildung 37: „Hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit des pp60c-src-Inhibitors Herbimycin A. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten nach drei Tagen Inkubation mit Herbimycin A. DMSO als Lösungsmittel wurde als Kontrolle in entsprechender Konzentration mitgeführt. 100fache Vergrößerung.

3.1.11.1. Zellzyklus-Analysen von Herbimycin A-behandelten A818-6-Zellen in 3D-Kultur

Um zu untersuchen, ob die morphologischen Konsequenzen des Inhibitors eine Folge einer veränderten Proliferation oder Apoptoserate sind, wurde eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt (**Abbildung 38**). Nach 24stündiger Inkubation der Zellen mit 12 µM Herbimycin A ($IC_{50} = 12 \mu M$ (Calbiochem)) in 3D-Kultur konnte eine Zunahme des Zellanteils, der sich in der subG1-Phase befand, festgestellt werden. Des weiteren konnten aber keine wesentlichen Änderungen im Zellzyklus nachgewiesen werden.

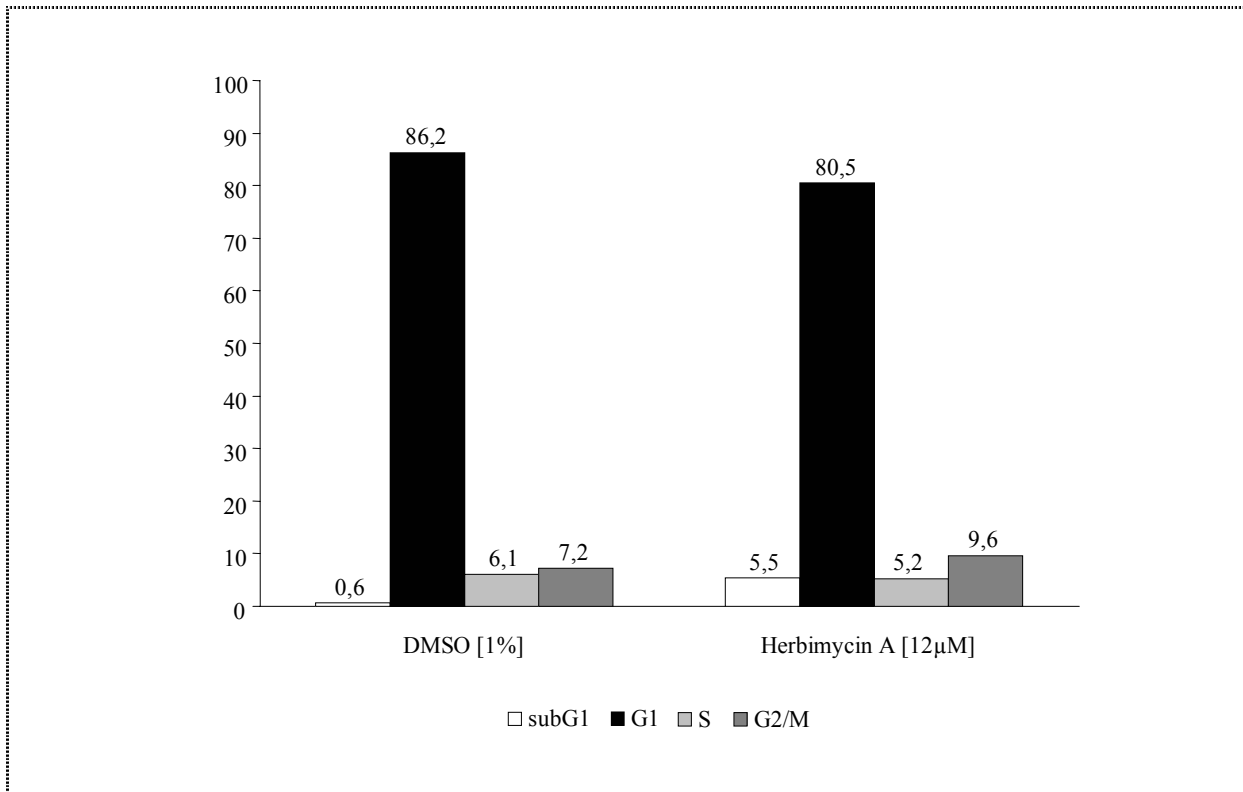


Abbildung 38: Zellzyklus-Analyse von Herbimycin A behandelten A818-6-Zellen unter 3D-Kulturbedingungen. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel, eingesetzt in entsprechender Konzentration. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

3.2. A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung

3.2.1. „hollow sphere“-Entwicklung in Abhängigkeit von der Zelldichte

Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, wie die „hollow sphere“-Entwicklung zeitlich vonstatten geht. Eine Hypothese ist, dass Siegelring-ähnlich Zellen die initiale Struktur der „hollow sphere“-Bildung darstellen. Weiterhin zeigte Dr. Lehnert auch Ähnlichkeiten zu dem bereits beschriebenen Phänomen „clutching“ (Dissertation L. Lehnert 2000). „Clutching“ wurde als eine Einkapselung einer epithelialen Zelle durch eine andere charakterisiert und stellt ein sehr frühes Ereignis in der Lumenentwicklung dar (Lincz et al., 1997).

Aufgrund von Beobachtungen wurde angenommen, dass es in Abhängigkeit von dem gewählten Kultivierungs-Protokoll mehrere Möglichkeiten der „hollow sphere“-Entwicklung gibt. Insbesondere die Wahl der initialen Zellzahl könnte einen deutlichen Einfluss auf den Entwicklungsprozess nehmen. Der folgende Versuch zeigte, dass bei einer geringen Zelldichte (25 Zellen/Kammer) die Zellen vermehrt als Einzelzellen vorlagen, während eine höhere Zelldichte (1000/Kammer) eher zur Bildung von Zellaggregaten führte (**Abbildung 39**). In der 3D-Kultur entwickeln die Einzelzellen meist eine Siegelringform aus, die charakterisiert wird durch die Ausbildung einer großen Vakuole, die Zytoplasma und Zellkern an den Rand drängt. Im weiteren Entwicklungsverlauf schien es einen

Zusammenschluss von mehreren Siegelringen gegeben zu haben, die letztlich eine „hollow sphere“ bildeten.

Bei Zellaggregaten war zu beobachten, dass bereits nach zwei Tagen eine Lumenbildung im Inneren der zunächst kompakten Aggregate auftrat, die sich mit der Zeit ausweitete bis schließlich nur noch die äußere Zellschicht vorhanden war (**Abbildung 39**).

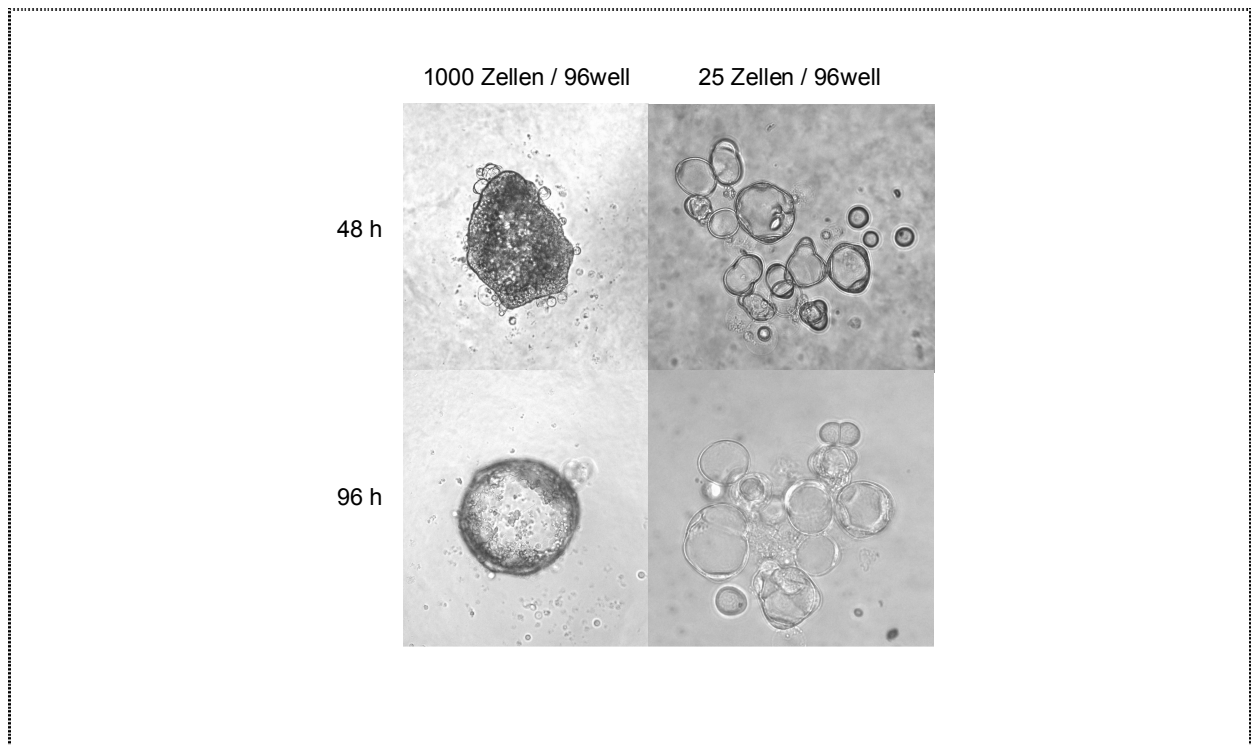


Abbildung 39: A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung in Abhängigkeit von der Zelldichte. A818-6-Zellen wurden in zwei verschiedenen Zelldichten auf Agarose-beschichteten 96- Kammerplatten ausgesät. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten nach 48 h und 96 h. 320fache Vergrößerung.

Um hier nähere Aussagen über den „hollow sphere“-Entwicklungsprozess – insbesondere über die initialen Ereignisse - geben zu können, wären kontinuierliche mikroskopische Aufnahmen von Beginn der Zellaussaat bis zur ausgebildeten „hollow sphere“ hilfreich, was aber aus technischen Gründen nicht durchführbar war. Stattdessen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Knippschild (Ulm) Serienaufnahmen von der Lumenbildung eines bereits ausgebildeten A818-6-Aggregats angefertigt (**Abbildung 40**). Anhand dieser Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich die Morphologie der äußeren Zellen von einer eher abgerundeten zu einer abgeflachten Form verändert (Volumen/Oberfläche nimmt ab). Daraus resultiert eine Größenzunahme des Aggregats, die einhergeht mit der Ablösung der äußeren Zellen von den inneren und der Bildung eines zentralen Lumens. Die im Inneren verbliebenen Zellen scheinen dagegen keine geordneten Zell-Zellverbindungen aufzuweisen, liegen demnach als Einzelzellen vor und sterben vermutlich im Laufe der Zeit.

Zu welchem Mechanismus die Zellen für die Lumenbildung greifen, bleibt noch im Detail zu klären. Vermutlich kommt es einerseits zur Ausrichtung der äußeren Zellen, verbunden mit einer

Polarisierung und der oben beschriebenen morphologischen Veränderungen sowie zur Apoptose der inneren Zellen.

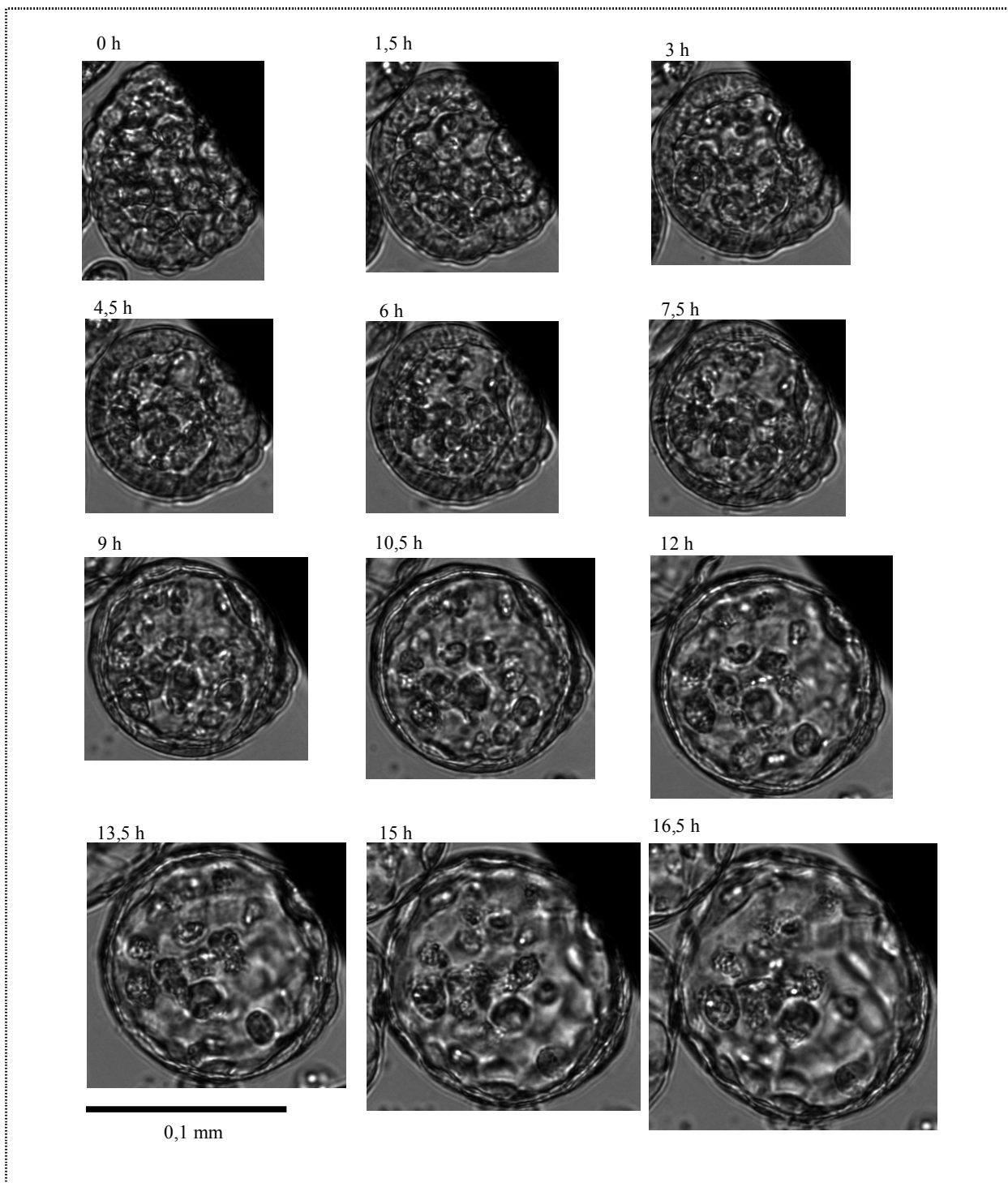


Abbildung 40: Serienaufnahmen von der A818-6-“hollow sphere“-Entwicklung. Lichtmikroskopische Aufnahmen. Durchgeführt von der Arbeitsgruppe des Herrn Dr. Knippschild (Ulm).

3.2.1.1. Die Rolle von CEACAM1 bei der „hollow sphere“-Entwicklung

Das „carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1“ (CEACAM1) greift in viele Signalkaskaden ein und beeinflusst biologische Funktionen wie Proliferation (Singer et al., 2000), Apoptose (Huang et al., 1999); (Kirshner et al., 2003) Angiogenese (Ergun et al., 2000), Tumorwachstum (Hsieh et al., 1995); (Kunath et al., 1995), Zellpolarisierung und auch Lumenbildung (Huang et al., 1999), (Kirshner et al., 2003).

CEACAM1-Expression: A818-6 „monolayer“-Zellen versus” hollow spheres”

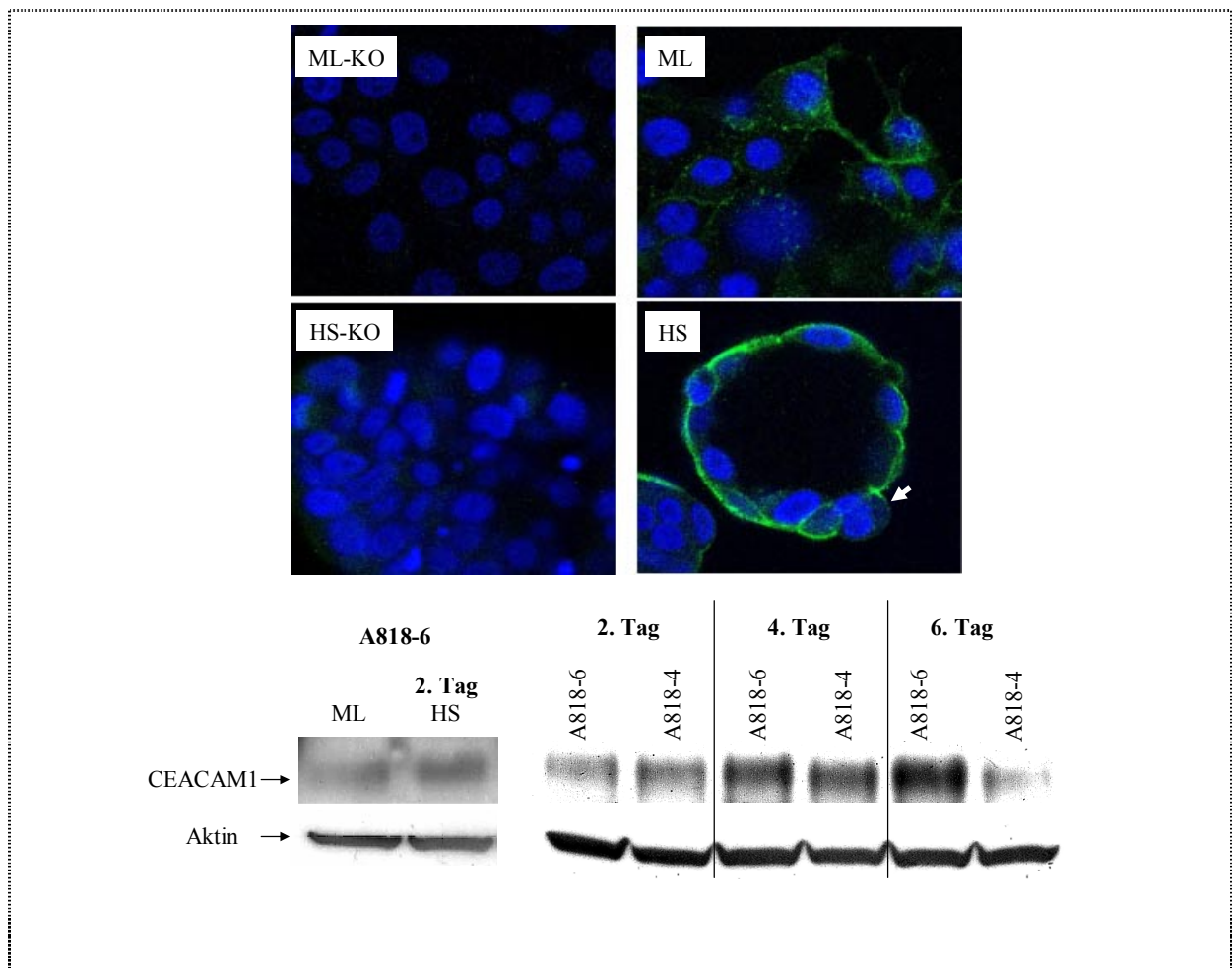


Abbildung 41: CEACAM1-Färbung von A818-6 „monolayer“- und „hollow sphere“-Zellen. ML-KO: Sekundär-Ak-Kontrolle am „monolayer“-Zellen. HS-KO: Sekundär-Ak-Kontrolle an „hollow spheres“-Zellen. CEACAM-1-Färbung (grün) in „monolayer“-Zellen (ML) und „hollow sphere“-Zellen (HS). Kerne sind blau dargestellt. Weißer Pfeil zeigt auf eine mitotische Zelle. Westernblot-Analyse. CEACAM1-Expression während der „hollow sphere“ Entwicklung im Vergleich zur A818-4-Sphäroid-Entwicklung. Aktin-Färbung als Ladekontrolle. Dieses Bild ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Westernblot-Analysen zeigten, dass die CEACAM1-Expression im Verlauf der „hollow sphere“-Entwicklung zunimmt und auch die immunzytochemischen Untersuchungen bestätigten dieses

Ergebnis (**Abbildung 41**). Neben der gesteigerten Expression war auch die Lokalisierung von CEACAM1 auffällig, so war in „monolayer“-Zellen eine eher diffuse Verteilung zu erkennen, während die „hollow spheres“ eine strikt apikale/laterale Färbung aufwiesen. Die CEACAM1-Expression schien während der Mitose herunterreguliert zu werden (weißer Pfeil in **Abbildung 41**).

A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit eines Anti-CEACAM1-Antikörpers

Durch den Einsatz eines monoklonalen Anti-CEACAM1-Antikörpers in der 3D-Zellkultur wurde untersucht, ob dieser eine Lumenbildung forciert oder inhibiert, was Rückschlüsse auf einen Einfluss von CEACAM1 auf die „hollow sphere“-Entwicklung liefern würde. In vorhergehenden Publikationen wurden vergleichbare Untersuchungen durchgeführt, die zur Annahme führten, dass CEACAM1 in der normalen Brustepithelzelllinie MCF10F unter 3D-Kulturbedingungen ein durch Apoptose erzeugtes Lumen hervorruft. Die Lumenausbildung konnte durch „antisense“ CEACAM1 oder in Anwesenheit eines Anti-CEACAM1-neutralisierenden Antikörpers reduziert werden (18 % bei einer Ak-Konzentration von 100 µg/ml) (Huang et al., 1999).

Der neutralisierende Anti-CEACAM1-Antikörper bewirkte in dem A818-6-System keine Veränderung in der Lumenentwicklung. Im Gegensatz dazu inhibierte der Epimorphin-neutralisierende Antikörper (MC-1) die Lumenbildung (**Abbildung 42**).

3.2.2. Caspase-abhängige Apoptose während der A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung

3.2.2.1. M30-Färbung unreifer A818-6 „hollow spheres“

Es wurde bereits in einigen Publikationen beschrieben, dass eine Lumenbildung durch Apoptose entstehen kann (Debnath et al., 2002); (Kirshner et al., 2003); (Linz-McGillem et al., 2004). Inwieweit dieses Phänomen auch in diesem Modell eine Rolle spielt, sollte die Färbung eines durch Caspasen erzeugten Spaltprodukts von Cytokeratin 18 zeigen (M30-Cytodeath). Dazu wurden A818-6-Zellen eingesetzt, die für 48 h unter 3D-Kulturbedingungen inkubiert worden waren. Demzufolge handelte es sich hierbei noch nicht um ausgereifte „hollow spheres“, sondern noch um kompakte Sphäroide. Zum Vergleich wurden auch A818-4-Sphäroide mitgeführt, die keine „hollow spheres“ ausbilden können. Vergleichend zu A818-4 sind in den A818-6-Sphäroiden vermehrt apoptotische Zellen (grüne Färbung) vorzufinden (**Abbildung 43**). In der konfokalen Mikroskopie wurde auch deutlich, dass sich die apoptotischen Zellen vorwiegend innerhalb der äußeren Zellschicht befinden.

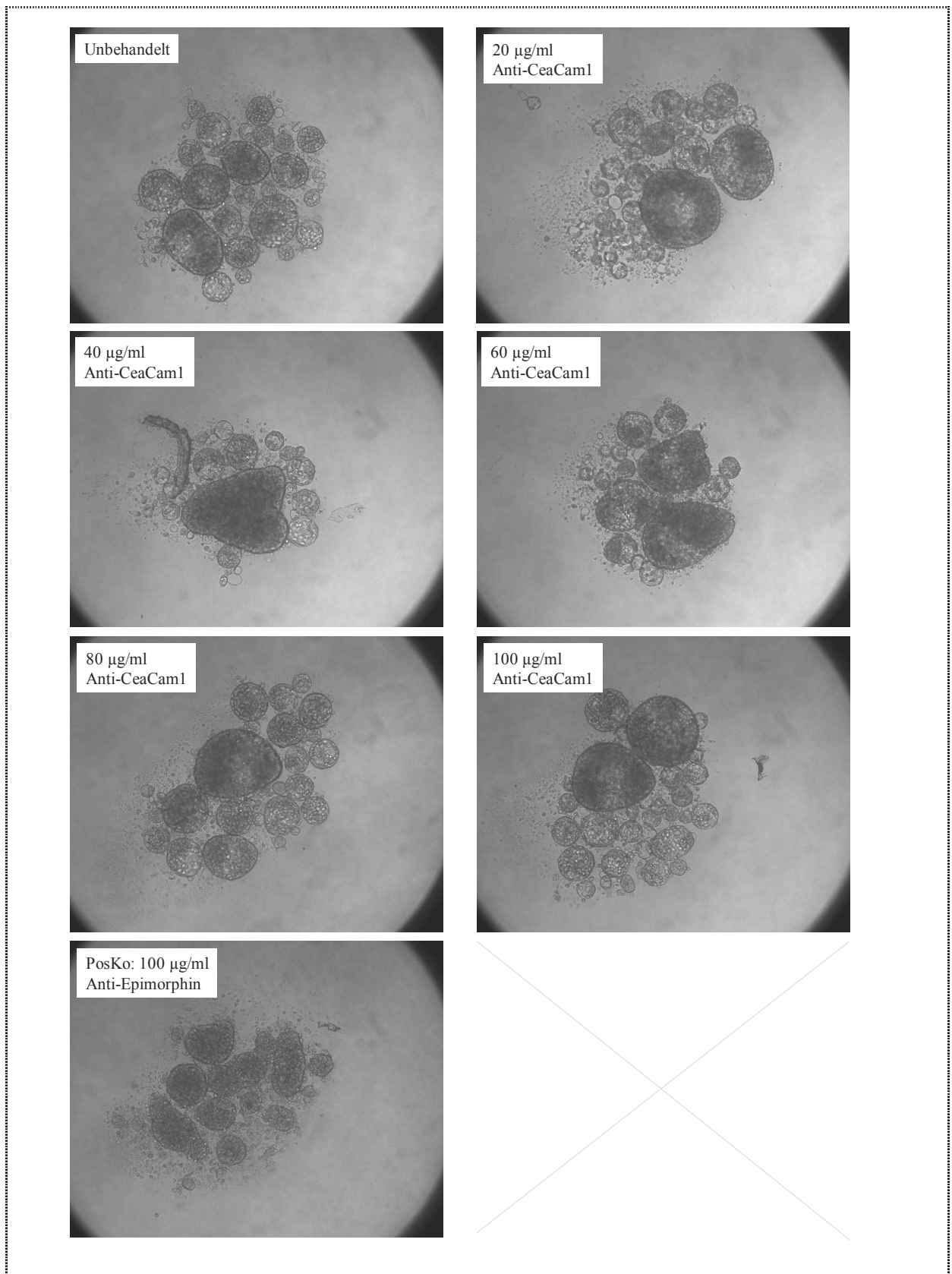


Abbildung 42: „Hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit eines neutralisierenden CEACAM1-Antikörpers. Die Antikörper (Anti-CEACAM1 und Anti-Epimorphin, gelöst in PBS) wurden 24 h nach Aussaat zur Kultur zugefügt. Die Aufnahmen erfolgten nach drei Tagen 3D-Kultur bzw. nach zwei Tagen Inkubation mit den Antikörpern. 100fache Vergrößerung.

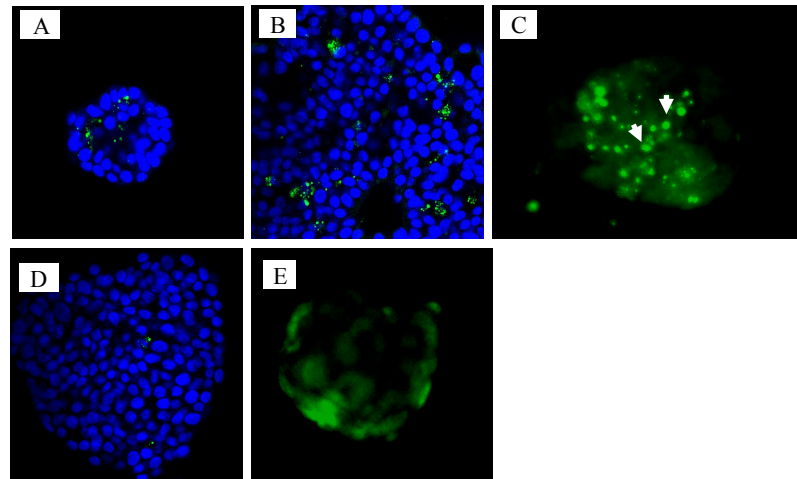


Abbildung 43: M30-Färbung von A818-4 und A818-6-Sphäroiden. Die Zellen wurden für 48 h unter 3D-Kulturbedingungen inkubiert. A und B: A818-6-Sphäroide im Laser scanning Mikroskop. Die Kerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst gefärbt (blau). Die Detektion des Spaltprodukts von Cytokeratin 18 erfolgte mit einem FITC-konjugierten M30-Antikörper (grün). C: M30-Färbung (grüne Spots) in einem A818-6-Sphäroid, Detektion im Fluoreszenz-Mikroskop. D: M30-(grüne Spots) und Kern-Färbung (blau) in einem A818-4-Sphäroid, Detektion im Laser Scanning Mikroskop. E: M30-Färbung in einem A818-4-Sphäroid, Detektion im Fluoreszenzmikroskop.

3.2.2.2. PARP-Spaltung während der „hollow sphere“-Entwicklung

PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase) ist ein nukleäres Enzym, welches hochkonserviert in höheren Eukaryoten vorkommt und dort an der DNA-Reparatur sowie der Apoptose-Antwort in der Zelle beteiligt ist (Berger, 1985; Satoh und Lindahl, 1992). PARP wird in apoptotischen Zellen infolge der Aktivierung von Caspase 3 gespalten.

Lysat aus Zell-Aggregaten > 40µm

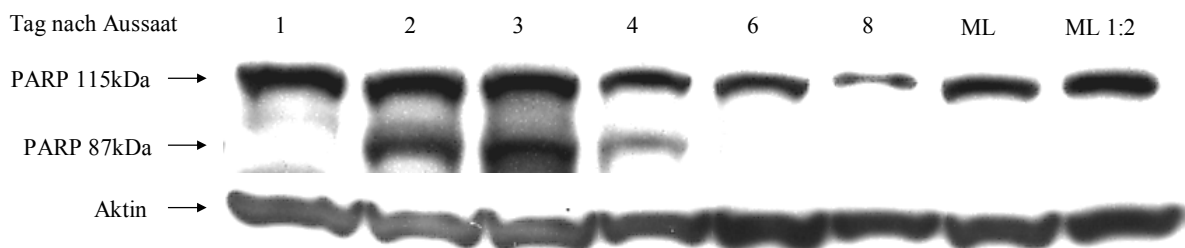


Abbildung 44: PARP-Spaltung während der „hollow sphere“-Entwicklung. Die Lysatherstellung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. ML = A818-6 „monolayer“-Lysat ML1:2 = dasselbe „monolayer“-Lysat 1:2 verdünnt. Western blot-Analyse.

Insbesondere zwischen dem zweiten und vierten Tag konnte neben dem ungespaltenen PARP (115 kDa) auch das ca. 87 kDa große Spaltprodukt detektiert werden. Allerdings war auch am achten Tag noch eine Abnahme von ungespaltenem PARP nachweisbar (**Abbildung 44**).

3.2.2.3. „Hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk

Der bisherige Apoptosenachweis basierte in allen Fällen auf einer Caspase-Aktivierung, was auf eine Caspase-abhängige Apoptose schließen lässt. Um zu untersuchen, inwieweit dieser Prozess für die Lumenbildung der A818-6-„hollow spheres“ von Bedeutung ist, sollte die Morphogenese in Anwesenheit des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk beurteilt werden.

Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 50 μM direkt nach der Zellaussaat hinzugefügt. Jedoch zeigte sich nach drei Tagen, dass die Inhibierung von Caspasen weder ausreichte, um eine Lumenbildung zu blockieren, noch um sie zu reduzieren (**Abbildung 45**).

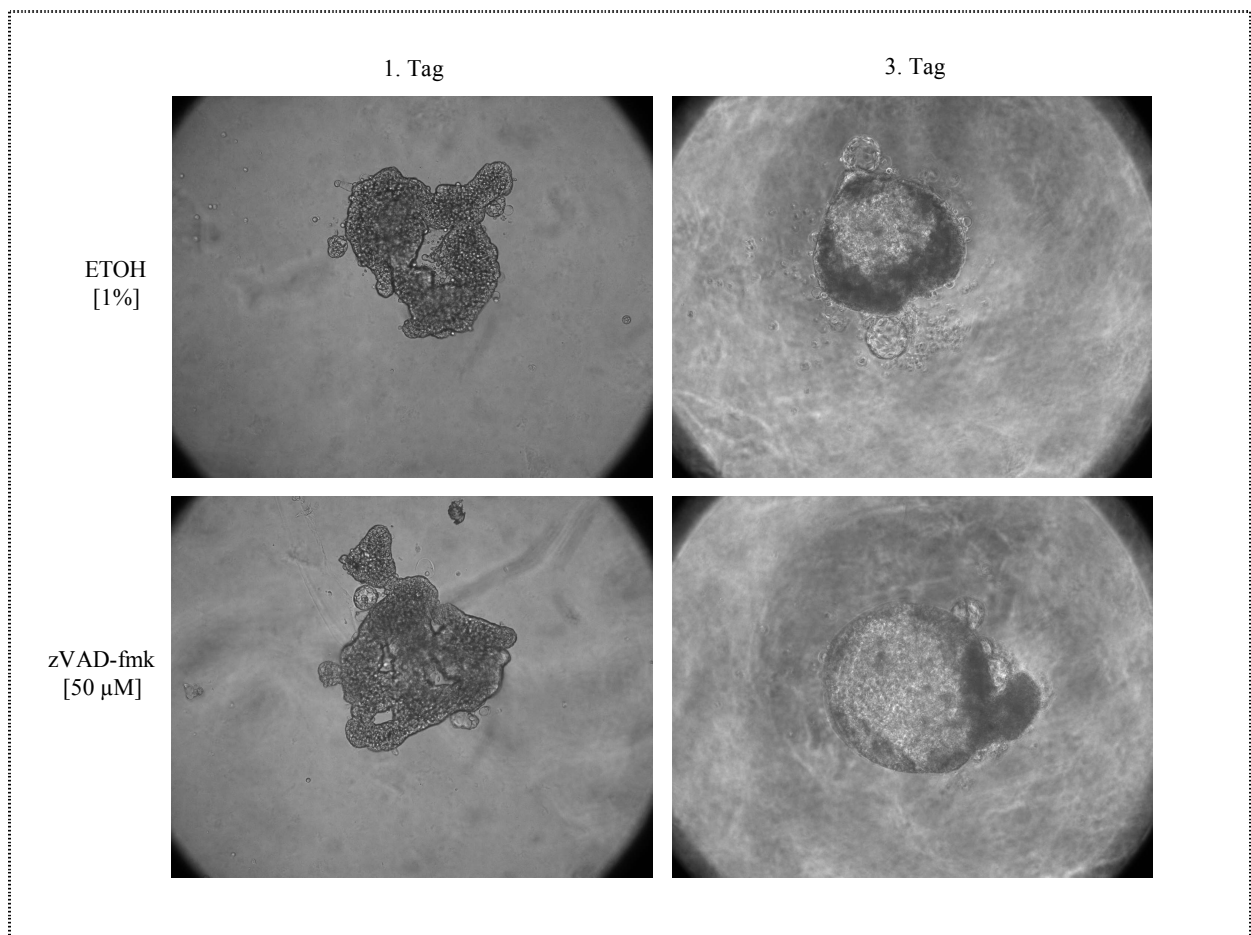


Abbildung 45: A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit von zVAD-fmk. A818-6 WT-Zellen wurden direkt nach Aussaat mit 50 μM zVAD-fmk, gelöst in Ethanol, oder nur mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt. Die Aufnahmen erfolgten nach einem Tag und nach drei Tagen nach Aussaat. Lichtmikroskopische Aufnahmen. 100fache Vergrößerung.

3.2.2.4. Caspase-abhängige Apoptose während der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit des sauren Sphingomyelinase-Inhibitors Desipramin und des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk

Wie bereits zuvor dargestellt, inhibiert der saure Sphingomyelinase-Inhibitor Desipramin die Bildung eines Lumens während der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung. Da in vielen Veröffentlichungen dem Ceramid bereits eine modulierende Wirkung auf den programmierten Zelltod zugeschrieben wurde, der sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig sein kann, sollte dessen Einfluss auf die Apoptose während der „hollow sphere“-Entwicklung näher betrachtet werden. Des Weiteren wurde zur Kontrolle der pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk eingesetzt. Da zVAD-fmk die Lumenbildung nicht blockierte (**Abbildung 45.**), sollte durch die M30-Färbung untersucht werden, ob dieser Inhibitor während der „hollow sphere“-Entwicklung die zuvor beobachtete Cytokeratin18-Spaltung reduziert.

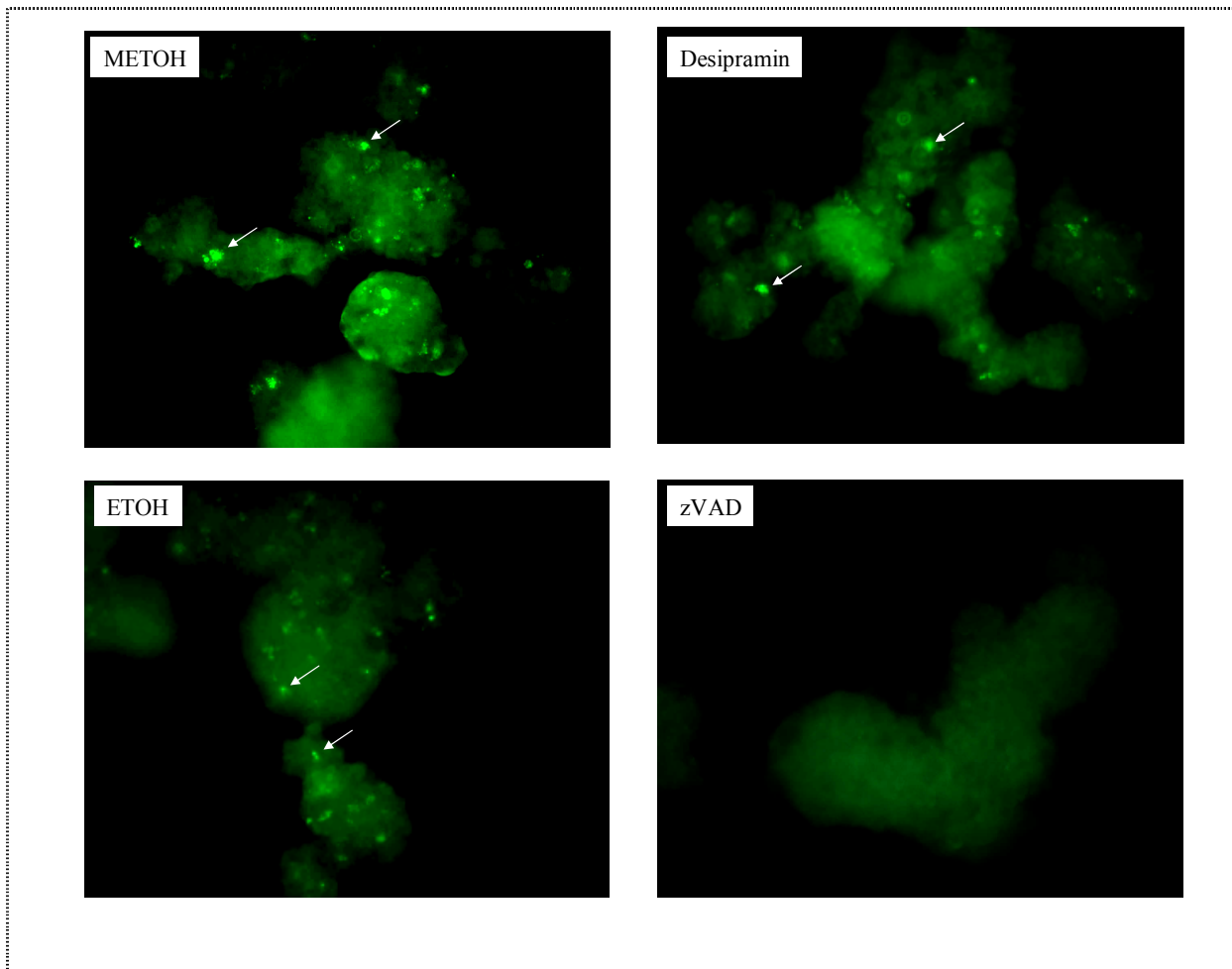


Abbildung 46: M30-Färbung von zwei Tage alten Prä-„hollow spheres“ in Anwesenheit von zVAD und Desipramin. Die grünen Spots stellen das Cytokeratin18-Spaltprodukt dar. 200fache Vergrößerung. Abbildung ist repräsentativ für mindestens zwei Experimente.

Die M30-Färbung zeigte deutlich eine effektive Inhibierung der Cytokeratin18-Spaltung in den zVAD-fmk-behandelten Zellen, wohingegen in Anwesenheit von Desipramin diese Inhibition nicht zu beobachten war. Dieses Ergebnis zeigt, dass Caspase-abhängige Apoptose bei der Lumenbildung von A818-6“hollow spheres“ keine Rolle spielt.

3.2.2.5. Inhibierung von Caspase-unabhängigen Apoptose-Prozessen während der A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung

Mills (Mills et al., 2004) erklärte die Lumenbildung während der Morphogenese der Brustepithelzelllinie MCF-10A mit einem TRAIL-induzierten (TRAIL: „tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand“) Prozess der Autophagie. Auch Ceramide können Autophagie induzieren, wie schon in malignen Gliomazellen nachgewiesen wurde (Daido et al., 2004). Ein gängiger Inhibitor ist 3-Methyladenin, der die Autophagie in den frühen Phasen inhibiert (Seglen und Bohley, 1992). Außerdem blockiert es Phosphatidylinositol 3-phosphat Kinasen (PI3K) (Blommaart et al., 1997).

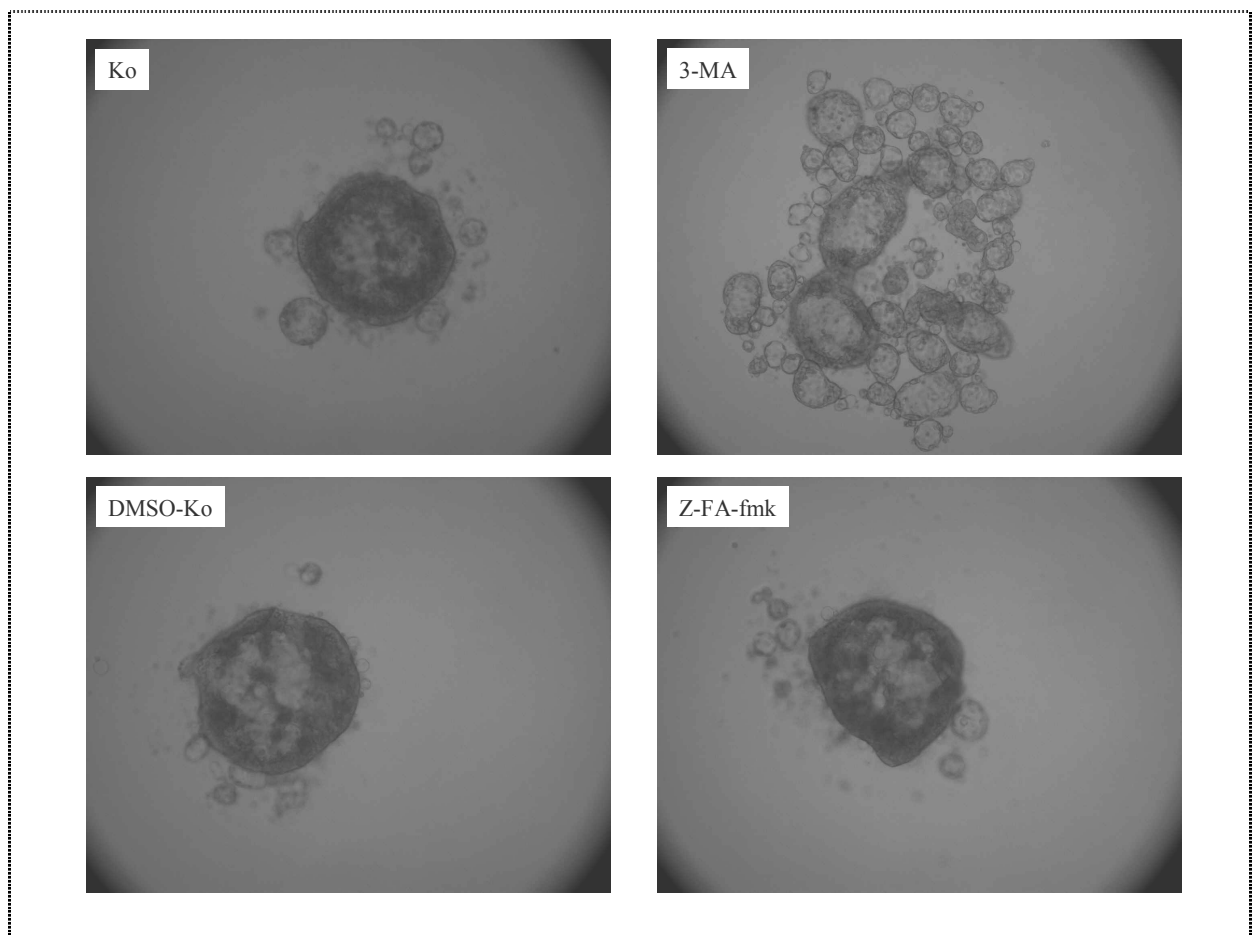


Abbildung 47: „Hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit von 3-Methyladenin oder zFA-fmk. Die Inhibitorbehandlung erfolgte direkt nach Aussaat. Die Aufnahmen wurden nach zwei Tagen vorgenommen. 100fache Vergrößerung.

Der Einsatz des Inhibitors 3-Methyladenin (10 mM) in unserem System führte nicht zur Inhibierung der Lumenbildung in A818-6-„hollow spheres“, im Gegenteil: Es schien sogar einen fördernden Einfluss auf die „hollow sphere“-Entwicklung zu haben, denn nach zwei Tagen waren schon vergleichsweise saubere „hollow spheres“ vorzufinden (**Abbildung 47**). Die gewählte

3-Methyladenin-Konzentration entsprach der Konzentration, bei der in der Zelllinie MCF-10A eine Inhibition der TRAIL-induzierten Vakuolen-Bildung beobachtet wurde (Mills et al., 2004). Die initialen Zellaggregate waren infolge der Inhibitorbehandlung kleiner und konnten so entsprechend schneller saubere „hollow spheres“ entwickeln, die ebenfalls entsprechend kleiner ausfielen.

Andere Proteasen, wie z. B. die Cathepsine (lysosomale Proteasen), können ebenfalls eine wichtige Rolle bei alternativen Formen des programmierten Zelltods spielen (Leist und Jaattela, 2001). Entsprechend wurde die Wirkung eines solchen Cathepsin-Inhibitors (zFA-fmk) auf die A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung untersucht. Jedoch konnte auch mit diesem Inhibitor in einer Konzentration von 50 μ M (Konzentration entspricht der aus diversen Publikationen (Bang et al., 2004) die „hollow sphere“-Bildung nicht blockiert werden (**Abbildung 47**). Diese Daten sprechen dafür, dass auch Caspase-unabhängige apoptotische Prozesse im Verlauf der „hollow sphere“-Entwicklung vermutlich nicht ausschlaggebend für die Lumenbildung sind.

3.2.3. „Hollow sphere“ Entwicklung in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren

Um Hinweise zu erhalten, welche Signalwege möglicherweise bei der „hollow sphere“ Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die „hollow sphere“-Bildung getestet.

3.2.3.1. Inhibierung der MAP-Kinasen MEK und p38

Aguirre-Ghiso (Aguirre-Ghiso et al., 2003) beschrieb die Erk/p38-Aktivitäts-Ratio als möglichen Indikator für Proliferation oder Tumor-„dormancy“, die wiederum abhängig ist von bestimmten Oberflächen-Rezeptoren bzw. deren Aktivierung. So zeigte eine hohe p38/Erk –Aktivitäts-Ratio einen Wachstumsarrest der Tumorzellen an (Tumor-„dormancy“). Auch in den A818-6-„hollow spheres“ fand man eine Abnahme der Erk-Phosphorylierung (Diplomarbeit J. v. Böttcher). Jedoch war ebenso eine Abnahme der p38-Aktivierung zu erkennen. Auch in Anwesenheit eines Mek-Inhibitors (U0126 wirksame Inhibitorkonzentration 25 μ M) verlief die „hollow sphere“-Bildung unverändert. Es konnte weder eine Inhibition noch eine Stimulation beobachtet werden. Vergleichbares konnte auch für den p38-Inhibitor (wirksame Inhibitorkonzentration 10 μ M) festgestellt werden (**Abbildung 48**).

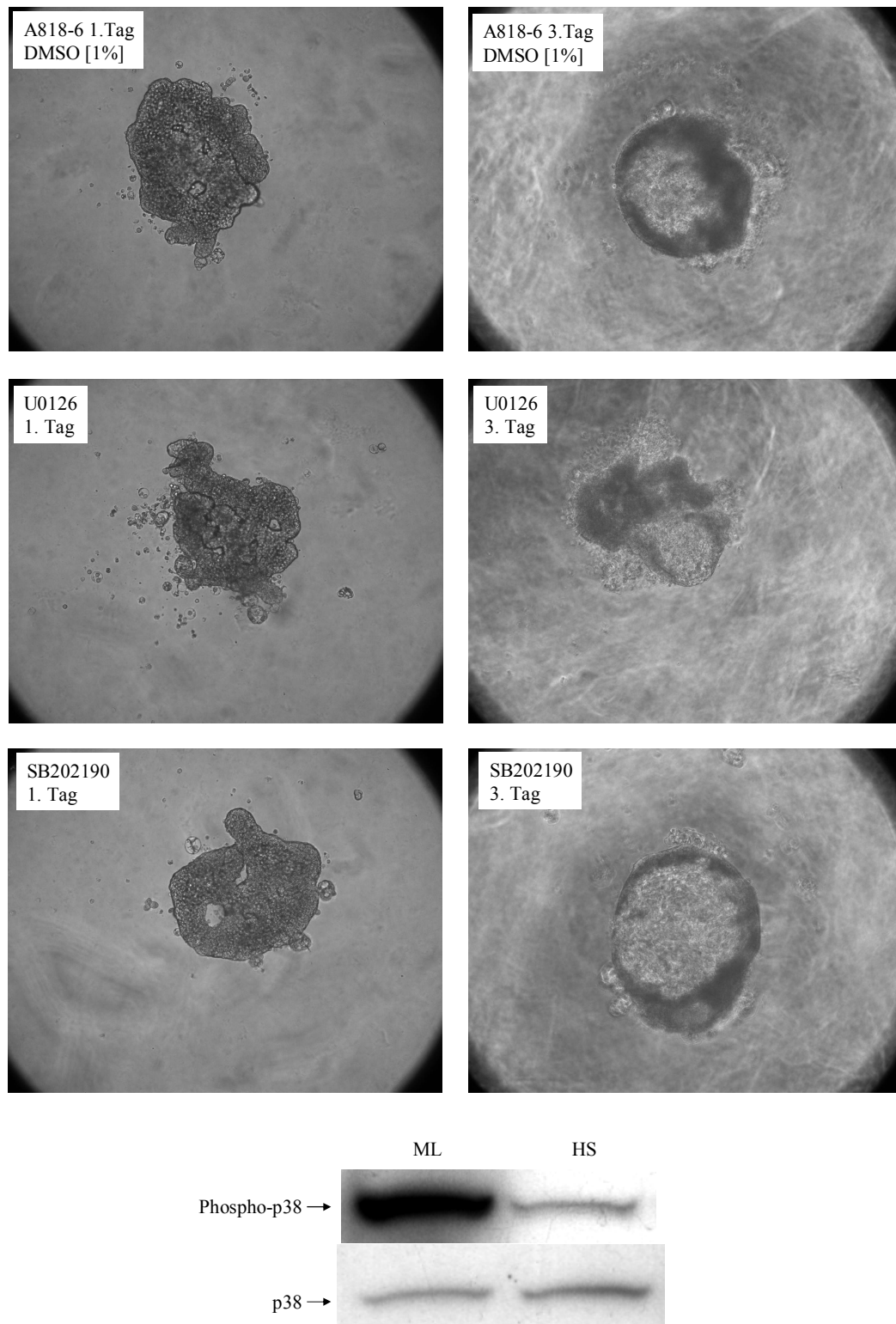


Abbildung 48: A818-6“hollow sphere“-Entwicklung in Anwesenheit eines Mek-Inhibitors (U0126) und eines p38-Inhibitors (SB202190). Inhibitorzugabe erfolgte direkt nach Aussaat der Zellen. Die Aufnahmen wurden nach einem Tag und drei Tagen durchgeführt. 100fache Vergrößerung. Westernblot-Analyse zum Nachweis von aktiviertem p38 in A818-6-“hollow spheres“ (HS) bzw. im korrespondierenden „monolayer“ (ML).

3.2.3.2. Inhibierung von PKCs

PKCs sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. Apoptose (Trauzold et al., 2003), Proliferation (Pintus et al., 2003); (Yamamoto et al., 2003) Morphogenese (Pagliocca et al., 2002); (Cardenas et al., 2000) sowie an Sekretions- und Proteintransport-Prozessen (Ghanekar und Lowe, 2005); (Kermorgant et al., 2004); (Marinari et al., 2003). Die Regulation der PKC-Aktivität kann über viele Wege vonstatten gehen, auch Wechselwirkungen zwischen PKCs und Ceramiden wurden schon in einigen Publikationen beschrieben (Shin et al., 2002); (Wang et al., 1999).

Der Inhibitor Gö6983 inhibiert die PKC-Isoformen, außer PKD bzw. PKC μ , bei einer Konzentration von 100 nM. Die Isoform PKD bzw. PKC μ wird dagegen erst bei einer Konzentration von 20 μ M inhibiert. In diesen beiden Konzentrationen wurde die Wirkung von Gö6983 auch auf die „hollow sphere“-Entwicklung getestet. Zusätzlich wurde ein weiterer, PKC δ -spezifischer Inhibitor, das Rottlerin, eingesetzt.

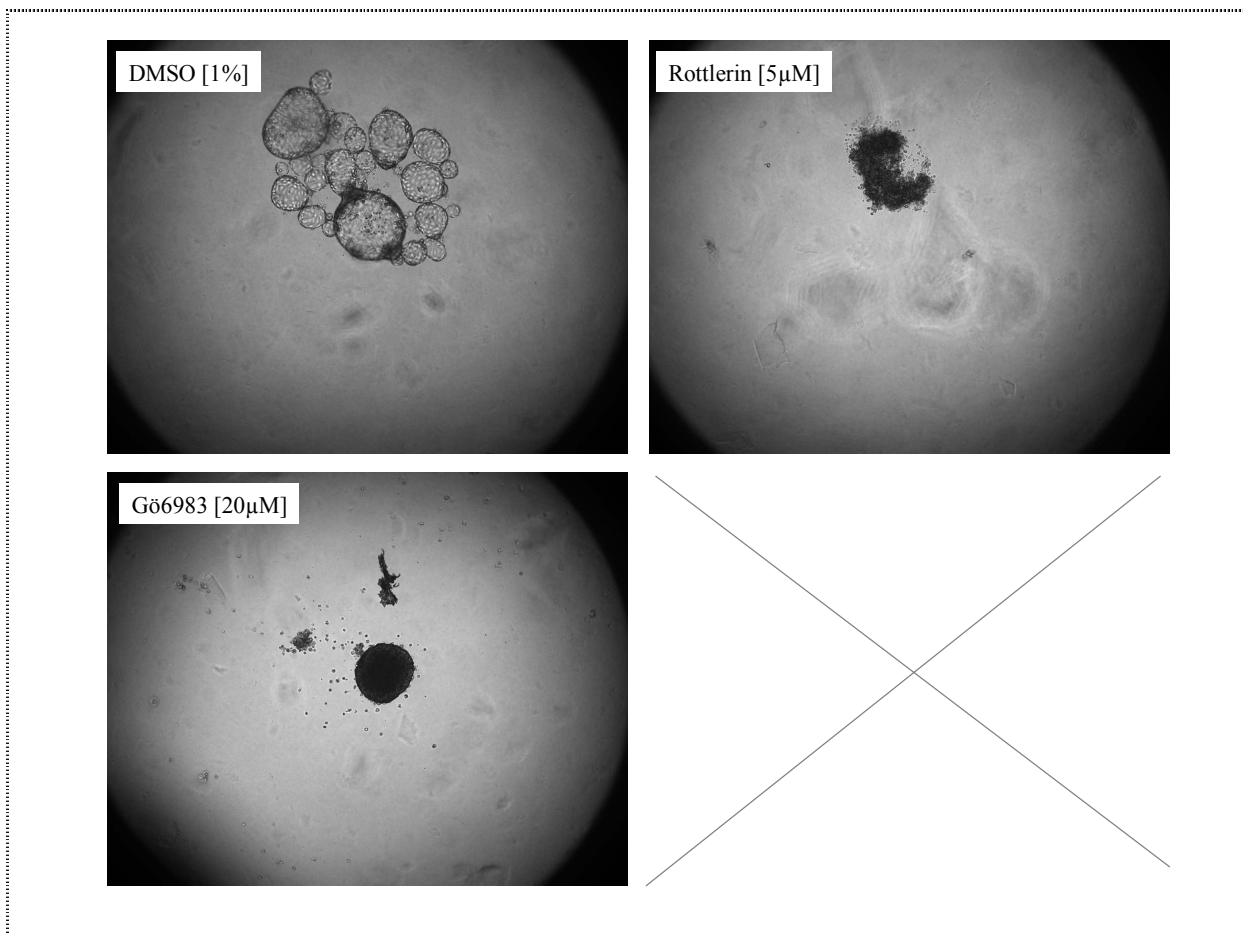


Abbildung 49: A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung nach Behandlung mit Rottlerin und Gö6983. Das Lösungsmittel DMSO wurde in entsprechender Konzentration als Kontrolle mitgeführt. Die Aufnahmen erfolgten am 4.Tag nach Aussaat und Inhibitorbehandlung. 50fache Vergrößerung.

Gö6983 in einer Konzentration von 100 nM zeigte keinen Effekt auf die A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung (nicht gezeigt), bei einer Konzentration von 20 μ M entwickelten sich die A818-6 –

Aggregate, die sich nach dem ersten Tag unter 3D-Kulturbedingungen gebildet hatten, nicht weiter, es fand keine Lumenbildung mehr statt (**Abbildung 49**).

Der PKC δ -Inhibitor Rottlerin hatte einen ähnlich drastischen Einfluss auf die „hollow sphere“-Entwicklung: Die Zellen bildeten nach dem ersten Tag lediglich kleine Aggregate.

Einfluss der PKC-Inhibitoren auf die „hollow sphere“-Integrität

Für die „hollow sphere“-Entwicklung scheint insbesondere PKC μ notwendig zu sein. Inwieweit dieses auch für die Aufrechterhaltung der „hollow sphere“-Struktur gilt, sollte die Inhibitorbehandlung an reifen „hollow spheres“ zeigen (**Abbildung 50**). Rottlerin und Gö6983 in Konzentrationen von 5 μ M bzw. 20 μ M wurden zu bereits ausgebildeten „hollow spheres“ gegeben. Nach drei Tagen war ein Effekt auf die „hollow sphere“-Struktur zu erkennen. Die Rottlerin-Behandlung der „hollow spheres“ führte langsam zu einer Abrundung der Zellen, was schließlich einen Zerfall der „hollow sphere“-Struktur zur Folge hatte.

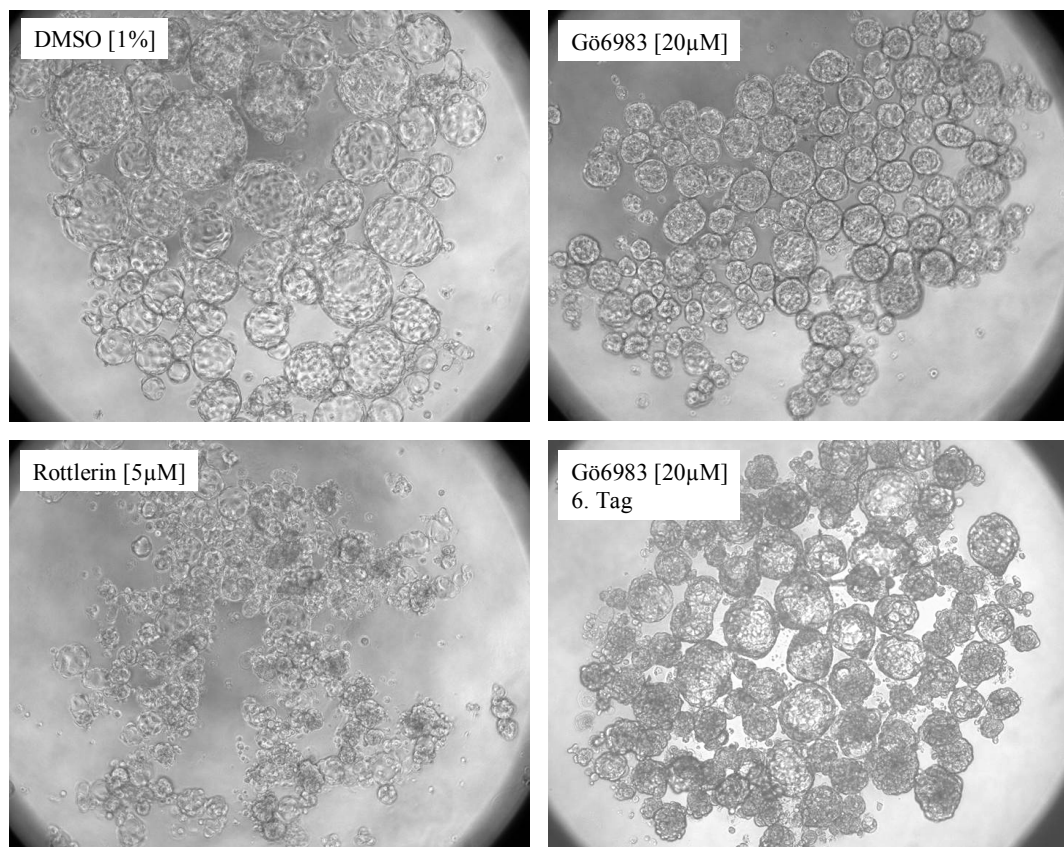


Abbildung 50: Einfluss der PKC-Inhibitoren auf die A818-6-„hollow sphere“-Integrität nach dreitägiger Behandlung. Die Inhibitorzugabe erfolgte erst drei Tage nach Aussaat der Zellen. Nach weiteren drei Tagen (bzw. sechs Tagen) Inkubation wurden die Aufnahmen gemacht. 100fache Vergrößerung.

Nach drei Tagen Behandlung mit Gö6983 waren die „hollow spheres“ kleiner als die im Kontrollansatz. Insgesamt schienen auch die Zellen in der „hollow sphere“-Struktur“ eher von kubischer Morphologie zu sein, was auch den Größenunterschied der „hollow spheres“ erklären könnte. Nach sechs Tagen waren vermehrt kollabierte „hollow spheres“ zu verzeichnen.

Zellzyklus-Analyse der A818-6-Zellen nach 24stündiger Inhibitorbehandlung in 3D-Kultur

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die durch die Inhibitorbehandlung hervorgerufenen Effekte in Zusammenhang mit Apoptose oder Wachstumsarrest stehen. Dazu wurden zunächst die Zellen gemeinsam mit den entsprechenden Inhibitoren (Gö6983 und Rottlerin) ausgesät und für 24 h unter 3D-Kulturbedingungen inkubiert.

Bei den Gö6983 behandelten Zellen konnte eine Zunahme an toten Zellen festgestellt werden (**Abbildung 51**). Die Rottlerin behandelten Zellen zeigten dagegen etwas mehr Zellen, die sich in der S- und G2-Phase befanden. Dagegen war die subG1-Phase im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

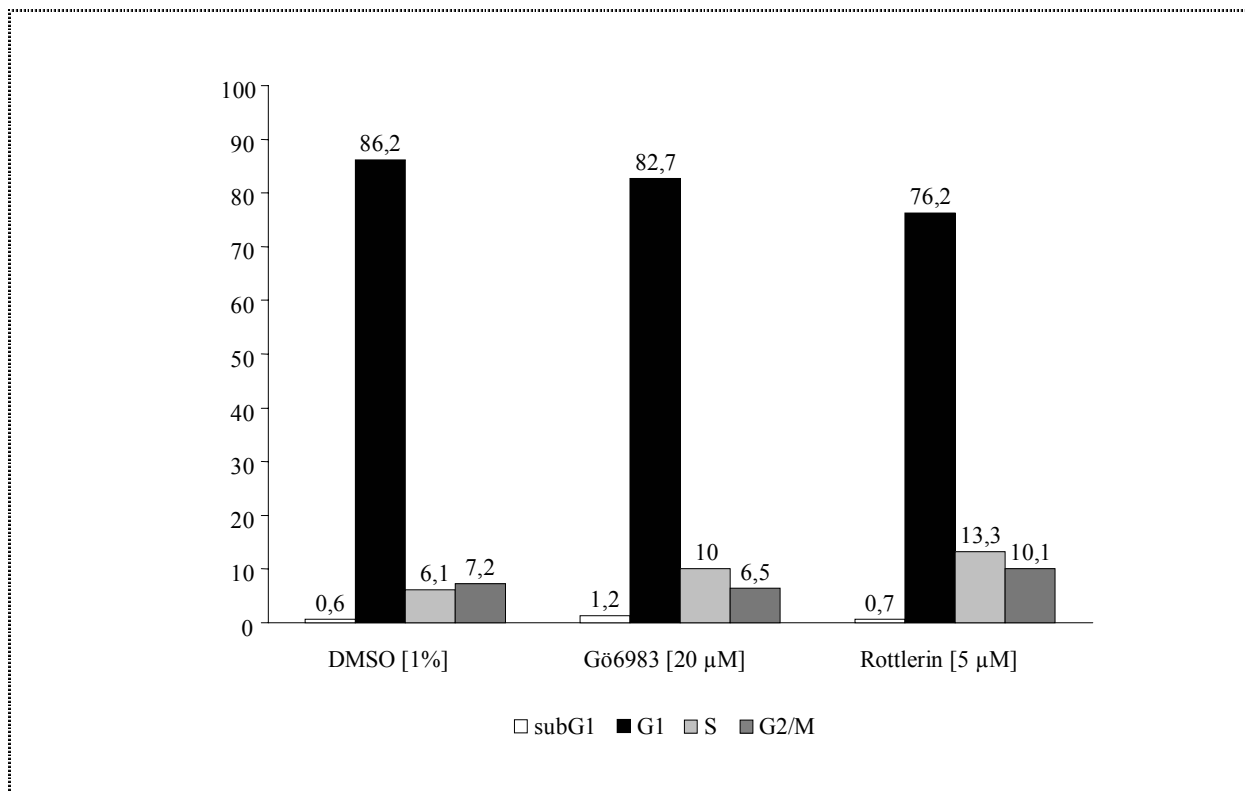


Abbildung 51: Auswertung der Zellzyklus-Analyse von Rottlerin und Gö6983 behandelten A818-6-Zellen unter 3D-Kulturbedingungen.

Einfluss der Inhibitoren auf das Zytoskelett der „monolayer“-Zellen

Die schlechte Aggregatbildung der A818-6-Zellen unter Einfluss des Inhibitors Rottlerin lässt darauf schließen, dass möglicherweise die Zelladhäsion negativ beeinflusst wird. Dietrich et al. (Dietrich et al., 2001) beobachteten bereits eine Internalisierung von E-cadherin und beta-Catenin nach Rottlerin-

Behandlung von Keratinozyten. E-cadherin steht über Catenine in Verbindung mit dem Zytoskelett. Die Aktin-Färbung sollte Informationen darüber liefern, ob die veränderte Aggregatbildung möglicherweise die Folge einer Zerstörung des Zytoskeletts sein könnte.

Für diese Untersuchung wurden adhärente Monolayerzellen 24 h mit den Inhibitoren Rottlerin (5 μ M) oder Gö6983 (20 μ M) inkubiert und anschließend entsprechend gefärbt.

Während die Gö6983 behandelten Zellen keine veränderte Aktin-Verteilung aufwiesen, zeigte sich in den Rottlerin behandelten Zellen eine sichtbar schwächere Färbung des Aktins, dessen Verteilungsmuster ebenfalls auf Abnormalitäten hinwies (**Abbildung 52**).

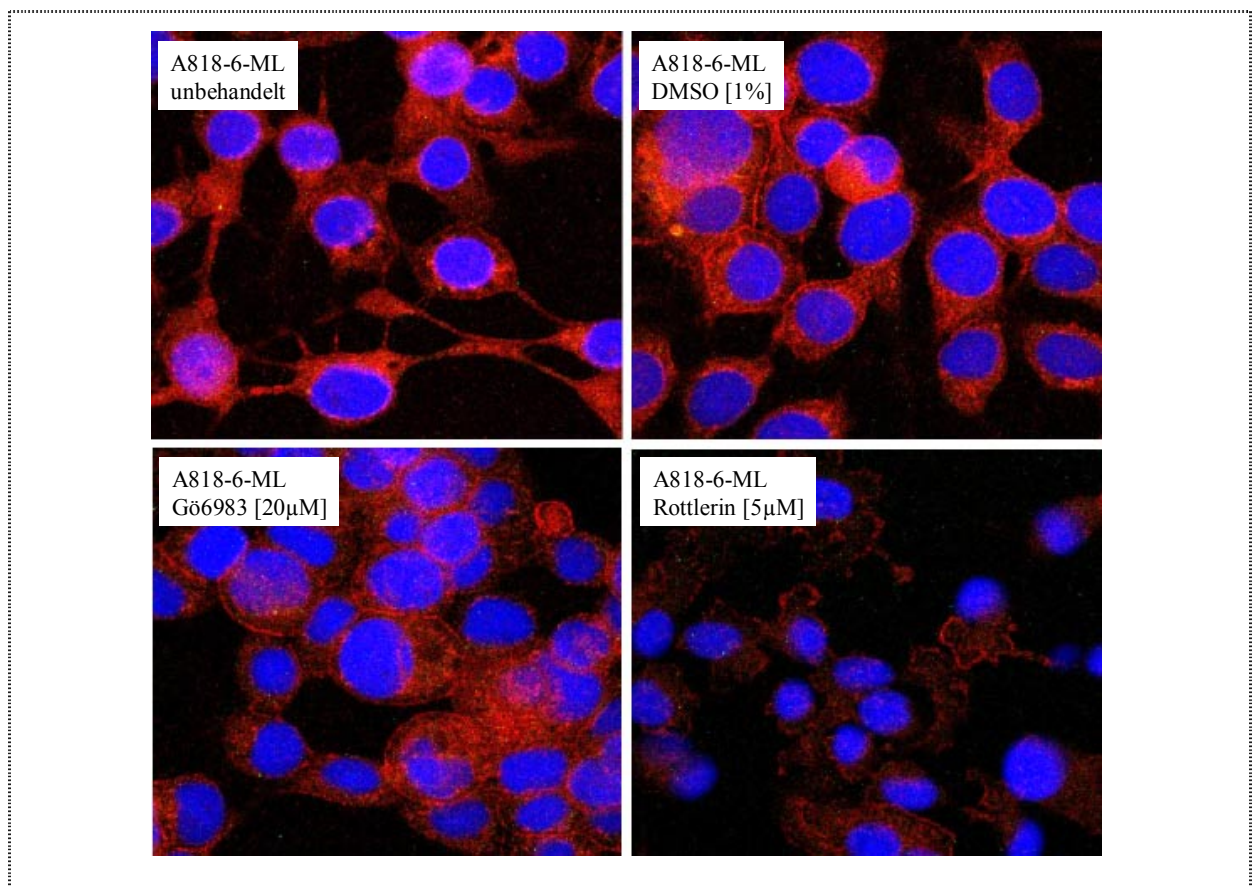


Abbildung 52: Aktin-Färbung in A818-6 „monolayer“-Zellen nach Inkubation mit Rottlerin und Gö6983. Kerne sind blau und Aktin ist rot dargestellt.

Einfluss von Gö6983 und Desipramin auf die Polarität von A818-6-Zellen unter 3D-Kulturbedingungen:

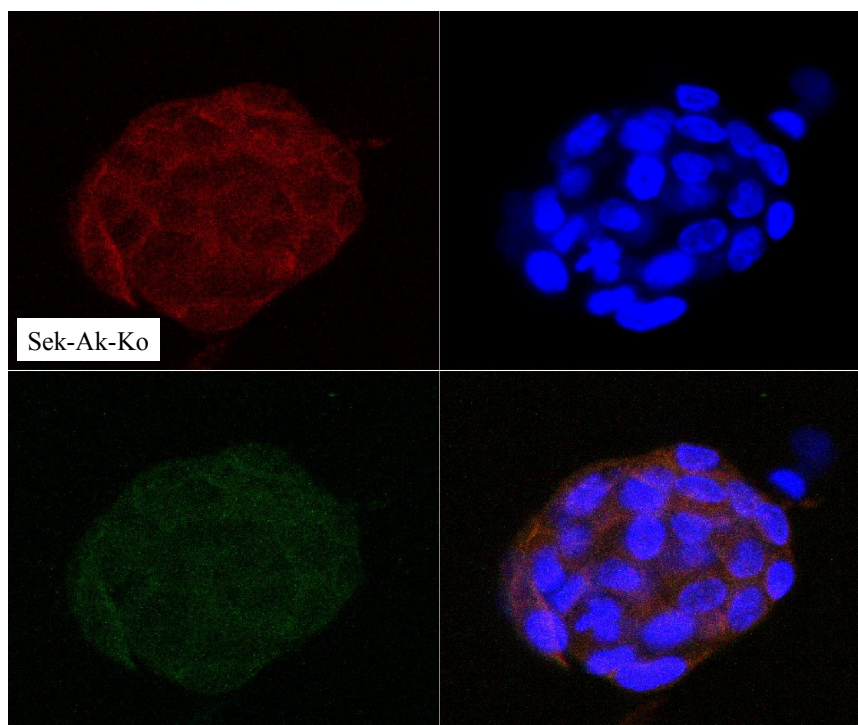
Um zu untersuchen, welchen Einfluss die „hollow sphere“-Bildung inhibierenden Substanzen Desipramin und Gö6983 auf die Zellpolarität ausüben, wurde die Topologie von dem „tight junction“-Protein ZO-2 und dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 in Abhängigkeit von den Inhibitoren untersucht (**Abbildung 53**). Diese beiden Moleküle wurden ausgewählt, weil CEACAM1 eine im Gegensatz zum korrespondierenden „monolayer“ strikt apikale/laterale Lokalisation in der „hollow

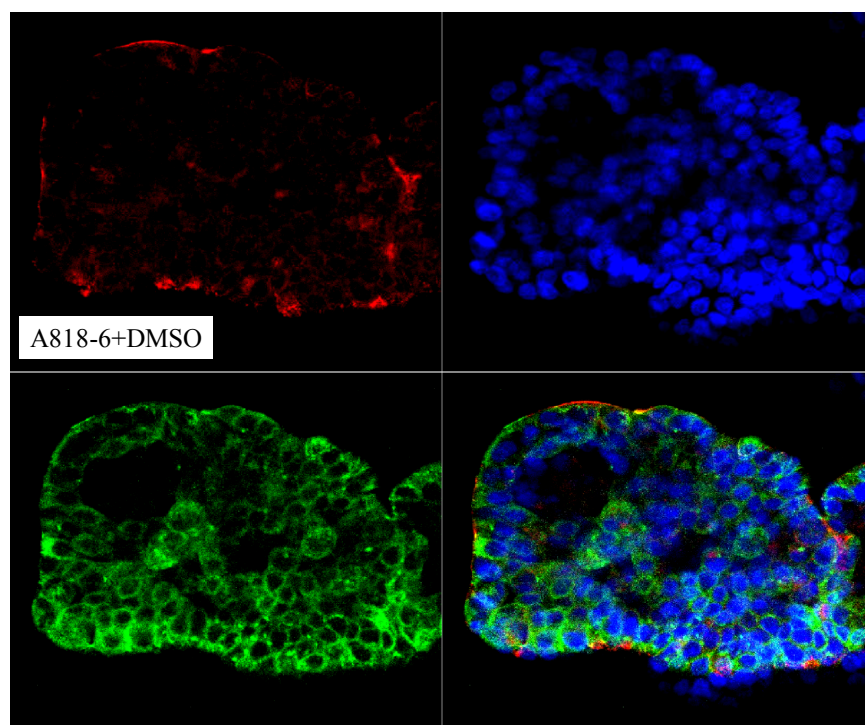
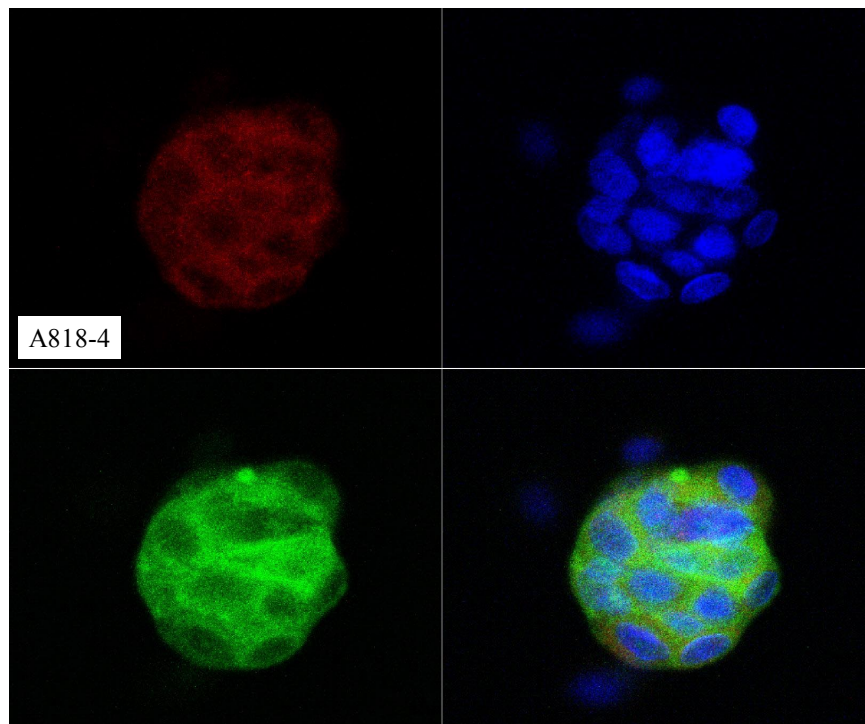
sphere“-Struktur einnimmt. „Tight junctions“ dagegen nehmen eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität ein. Zum Vergleich wurde die nicht-lumenbildende Zelllinie A818-4 mitgeführt.

Die ZO-2-Färbung der A818-4-Zellen war im Vergleich zu den A818-6-Zellen nicht klar definiert. Trotz der fraglichen CEACAM1-Färbung in A818-4 wurde deutlich, dass die CEACAM1-Verteilung in A818-4-Sphäroiden nicht vergleichbar war zu der in A818-6 „hollow spheres“, das heißt keine deutliche apikale/laterale Lokalisation von CEACAM1.

Die Desipramin-behandelten Zellen zeigten eine klare membranständige ZO-2-Färbung an den Zell-Zellgrenzen. Auch die CEACAM1-Verteilung war vergleichbar zu den Kontrollzellen. Die ZO-2-Färbung der zentralen Zellen erschien stärker und gleichmäßiger an der Membran unter Desipramin-Einfluss als die der Kontrollzellen, was auf Membranveränderungen hindeuten könnte.

Des weiteren war evident, dass im Vergleich zur unbehandelten A818-6-Kontrolle, sowohl die CEACAM1- als auch die ZO-2-Verteilung in den Gö-6983-behandelten A818-6-Zellen deutlich diffuser war.





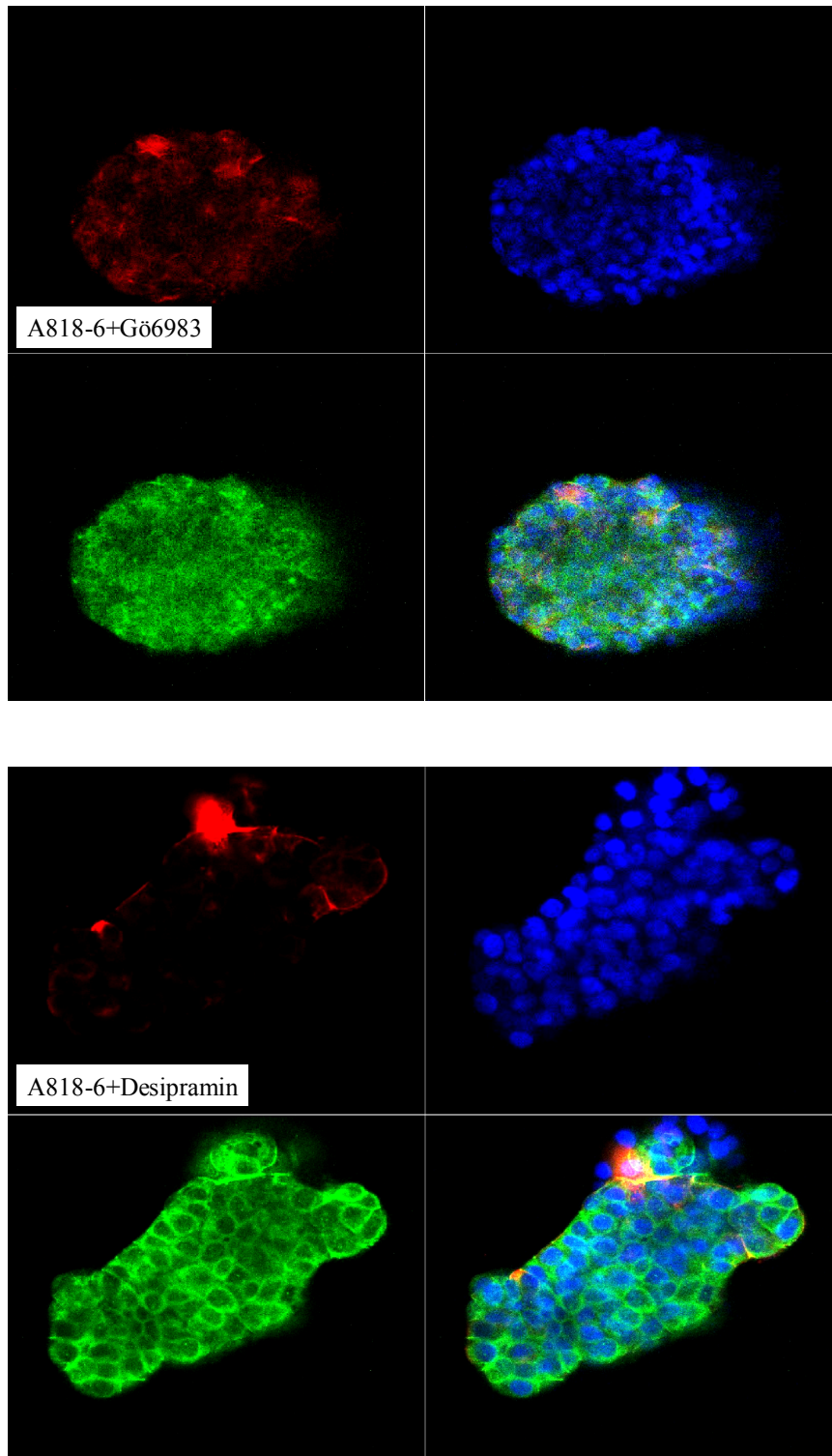


Abbildung 53: ZO-2 und CEACAM1-Färbung von A818-6 Prä-„hollow spheres“ in An- und Abwesenheit des sauren Sphingomyelinase-Inhibitors Desipramin und des PKC-Inhibitors G66983. Färbung von vier Tage alten A818-6 Prä-„hollows spheres“ bzw. zum Vergleich A818-4-Sphäroiden. ZO-2 (grün), CEACAM1 (rot), Kerne (blau).

4. Diskussion

4.1. 3-D- Kultur

Die Anzahl und Qualität der „hollow spheres“ ist von mehreren Faktoren abhängig, wie z.B. von der Zelldichte, dem FCS-Anteil, dem Trypsinierungsvorgang und vermutlich auch von dem vorhergehenden mechanischen Stress, dem die Zellen möglicherweise durch das Resuspendieren ausgesetzt waren.

Der Nachteil bei der A818-6-3D-Kultur liegt vorwiegend in ihrer Heterogenität, d.h. man findet in einem 3D-Kulturansatz nach nur wenigen Tagen so ziemlich alle Formen der „hollow sphere“-Reife, jedoch erhöht sich mit der Zeit der Anteil an ausgereiften „hollow spheres“. Die Entwicklungsdauer hängt zum Teil von der Größe der Zellaggregate ab, je größer, desto mehr Zeit braucht es bis zur Lumenbildung. Es ist also von Vorteil, die Aggregatgröße etwas zu beeinflussen, indem man die Zellsuspension nach dem ersten Tag auf 3D-Kultur vorsichtig mit einer Pipette durchmischt, damit sich nicht zu große Zellaggregate bilden.

Morphologische Untersuchungen wurden weitestgehend in 96-Kammerplatten durchgeführt, da hier die „hollow sphere“-Bildung sehr gut reproduzierbar war. Aufgrund der starken Oberflächenspannung und der begrenzten Zellzahl ist die initiale Aggregatbildung relativ einheitlich.

Deutlich unempfindlicher ist dagegen die Sphäroid-Bildung der A818-4-Zellen, die zwar auch in Abhängigkeit von der Zelldichte mehr oder weniger große Sphäroide ausbildet, jedoch entfällt hier der sensible Prozess der Lumenbildung. Dadurch sind die Sphäroid-Kulturansätze einheitlicher und demzufolge leichter zu reproduzieren.

4.2. Epimorphin

4.2.1. Klonierung der Epimorphin-Isoformen

Die Generierung der Epimorphin-codierenden DNA aus dem Plasmid SRalpha (Dr. Hirai, Yokohama), musste über PCR erfolgen, da zum einen die Schnittstellen im Plasmid SRalpha nicht mehr vorhanden bzw. nicht bekannt waren. Zum anderen war die Auswahl der Schnittstellen für die Klonierung in den zunächst dafür vorgesehenen retroviralen Vektor (pBABEpuro) begrenzt. Die PCR-Fragmente wurden mit Hilfe der Pfu-Polymerase amplifiziert, die zwei Vorteile gegenüber der Taq-Polymerase aufweist: Die Pfu-Polymerase ist genauer infolge ihrer 3'-5'-"proofreading"-Aktivität (Scott, Jr., 1991) und sie erzeugt glatte Enden, während die Taq-Polymerase dazu neigt, ein einzelnes A anzuhängen, wenn das 3'-Ende ein Cytosin-Nukleotid trägt (Testori et al., 1994).

Unüblicherweise erfolgten der Restriktionsverdau des retroviralen Vektors und die Ligation der Fragmente in einem Ansatz, da auf diese Weise die Ausbeute an positiven Klonen deutlich erhöht

wurde. Die „blunt-end“-Ligation stellte sich als ausgesprochen problematisch dar, da die Orientierung des DNA-Inserts nicht infolge überhängender, zur Vektor-DNA komplementärer Einzelstränge, vorgegeben war. Demzufolge musste die Orientierung des Inserts überprüft werden. Dies erfolgte mittels PCR und wurde durch die Sequenzierung des gesamten Inserts mit Ansequenzierung der Vektor-DNA abgesichert. Bei einer „blunt-end“-Ligation ist in der Regel zu erwarten, dass in 50 % der positiven Klone die Insert-DNA in „sense“-Orientierung im Vektor vorliegt. Erstaunlicherweise konnten mit dem retroviralen Vektor pBABEpuro keine Klone mit dem Insert in „sense“-Orientierung generiert werden. Auch die Erzeugung von „sticky-ends“ führte nicht zu dem gewünschten Erfolg, es gab keine positiven Klone. Diverse weitere retrovirale Vektoren wurden eingesetzt und letztlich konnte mit dem Vektor „pLXIN“ ein gutes Ergebnis erzielt werden.

4.2.2. Retrovirale Transduktion der Epimorphin-codierenden DNA in A818-6 und A818-4-Zellen

Nach der retroviralen Transduktion der beiden Zelllinien A818-6 und A818-4 erfolgte die Selektion mit G418 bis der Kontrollansatz, bestehend aus Wildtypzellen, absolut keine lebenden Zellen mehr enthielt, was nach ca. zwei Wochen der Fall war. Um näher an der *in-vivo*-Situation zu liegen erfolgte keine weitere Subklonierung der Zellen. Außerdem zeigte dieser Pool eine ausreichend starke Überexpression der verschiedenen Epimorphin-Isoformen im Westernblot (**Abbildung 11**). Die Überexpression der Isoformen war sogar derart stark, dass die endogene Expression in den A818-6 Wildtypzellen bei der gewählten Expositionszeit nicht mehr detektierbar war. Auch die Mehrfach-Transduktion brachte eine vergleichbar gute Expression der verschiedenen Epimorphin-Isoformen, wobei zwischen den Isoformen I und II auf Westernblot-Ebene nicht weiter unterschieden werden konnte. Weiterhin konnte nicht sichergestellt werden, dass tatsächlich von einem Zellklon mehrere Isoformen exprimiert wurden, jedoch ist davon auszugehen, dass in einem Pool vermutlich alle Varianten vorkommen, d.h. dass auch einige Zellen mehrere Isoformen exprimieren sowie auch eine unterschiedlich starke Expression der verschiedenen Isoformen zeigen.

Die Überexpression der Isoformen führte jedoch nicht zu einer stärkeren Komplexbildung, die 70 kDa und 150 kDa Banden waren unverändert, sowohl in den Einfach- als auch in den Mehrfach-Transduktanten (nicht gezeigt), was möglicherweise dafür spricht, dass sich diese SDS-resistenten Komplexe doch nicht ausschließlich aus Epimorphin-Monomeren zusammensetzen (Hirai, 1994), oder dass ein weiteres, daran beteiligtes Protein den limitierenden Faktor bei der Komplexbildung darstellt.

4.2.3. Detektion von Epimorphin

Immunzytochemische und durchflusszytometrische Analysen wurden mit einem monoklonalen Anti-Epimorphin-Antikörper durchgeführt. In der Immunzytochemie wurde Epimorphin sowohl in A818-6 als auch in A818-4-Zellen zytoplasmatisch, in vesikulären Strukturen nachgewiesen. Im Vergleich zu A818-4 konnte in A818-6-Zellen neben einer insgesamt stärkeren Epimorphin-Expression auch membranständiges Epimorphin detektiert werden (**Abbildung 9**). Dieser Unterschied in der Epimorphin-Verteilung könnte ein maßgebliches Kriterium bezüglich der morphoregulatorischen Funktion sein. Epimorphin-überexprimierende Zellen zeigten in der Epimorphin-Verteilung ein vergleichbares Bild wie die Wildtypzellen. Dies stützt die vorhergehenden Beobachtungen, dass der monomere Antikörper hauptsächlich den 150 kDa-Komplex erkennt, in dem das Epitop besser zugänglich ist als im monomeren Epimorphin-Molekül (Hirai, 1994). Weiterhin ist es ein Indiz dafür, dass die Überexpression der Epimorphin-Isoformen nicht zu einer vermehrten Komplexbildung beiträgt. Komplexe, die möglicherweise verantwortlich sind für die morphoregulatorische Funktion, die dem Epimorphin zugeschrieben wird.

Der Epimorphin-Nachweis im Westernblot wurde mit einem polyklonalen Epimorphin-Antikörper durchgeführt, der auch die monomeren Epimorphin-Moleküle erkennt. Im Gegensatz zur Immunzytochemie konnte man eine starke Überexpression der verschiedenen Epimorphin-Isoformen in den entsprechenden Transduktanten nachweisen, aber eine gesteigerte Komplexbildung war auch hier nicht zu erkennen.

Ein Problem stellte die Immunpräzipitation dar, denn diese konnte mit dem MC-1 Antikörper nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es konnte im anschließenden Westernblot zwar die Immunglobulinketten des Antikörpers detektiert werden, Epimorphin war jedoch nicht nachweisbar, wurde demnach nicht gebunden. Immunpräzipitation mit dem polyklonalen Antikörper hatte den Nachteil, dass zum einen die Spezifität reduziert und zum anderen die folgende Epimorphin-Detektion nicht möglich war, da dieser mit demselben Antikörper durchgeführt werden musste, so dass demnach auch die Immunglobulinketten detektiert wurden, wobei die leichte Kette in Höhe der Epimorphin-Banden zu finden ist. Mögliche Lösungswege, um Antikörper-Interferenzen auszuschalten, wie die radioaktive Markierung von Epimorphin mittels ³⁵S oder durch Anfügen eines HA- oder c-Myc-Tags oder auch die Immobilisierung des Antikörpers an die Trägersubstanz, konnten aus verschiedenen Gründen nicht durchgeführt werden.

Infolgedessen erfolgte der Epimorphin-Nachweis im Mediumüberstand nicht wie häufig über die Methode der Immunpräzipitation. Stattdessen wurde der Mediumüberstand durch Centricon-Säulen aufkonzentriert und schließlich mittels Westernblot auf Epimorphin analysiert (**Abbildung 12**). Epimorphin liegt im Mediumüberstand in einer verkürzten Form vor, was bereits von Hirai beobachtet wurde. Jedoch erfolgte in seinem Fall die Detektion von löslichem Epimorphin in der Milch von Mäusen. Er erklärt diese trunkierte Form mit einer Abspaltung von membrangebundenem Epimorphin

durch bestimmte Matrix-Metalloproteinasen, da dieser Effekt durch den Einsatz eines MMP-Inhibitors GM6001 aufgehoben werden konnte (Hirai et al., 2001). Welche Protease dafür verantwortlich ist, ist bisher noch nicht bekannt. Bei der Epimorphin-Isoform II in sowohl A818-4 als auch A818-6 wurde noch eine weitere Bande nachgewiesen, die noch kürzer ist als die 30 kDa – Form. Vermutlich ist hierbei noch zwischen den Isoformen und deren MMP-Spaltstellen zu unterscheiden. Im Gegensatz zu vorhergehenden Daten (Lehnert et al., 2001d) konnte in den Überständen der Wildtypzellen mit dieser Methode kein Epimorphin nachgewiesen werden.

4.2.4. Morphologie der Epimorphin-überexprimierenden A818-4- und A818-6-Zellen in 3D-Kultur

Die morphologische Begutachtung der transduzierten A818-4- und A818-6-Zellen unter 3D-Kulturbedingungen erfolgte zumindest in den ersten drei Tagen täglich, da in dieser Phase die entscheidenden Veränderungen stattfinden. Die beiden Zelllinien A818-4 und A818-6 unterscheiden sich morphologisch nach dem ersten Tag in 3D-Kultur nicht wesentlich. Beide aggregieren zu kompakten Sphäroiden und sogar die Siegelring-ähnlichen Zellen sind in der A818-4-3D-Kultur zu finden. Die morphologischen Veränderungen der beiden Zelllinien beginnen erst ab dem zweiten Tag deutliche Unterschiede anzunehmen. Während die A818-6-Sphäroide beginnen, ein Lumen zu formen, verändert sich die Morphologie der A818-4 Aggregate zumindest nicht auffällig. Des weiteren adhären A818-4-Sphäroide, wenn man sie wieder unter Standardkulturbedingungen inkubiert und bilden schließlich wieder einen Zellrasen aus. A818-6-„hollow spheres“ bleiben dagegen auch unter Standardkulturbedingungen in Suspension und verändern ihre Morphologie nicht. Dieses Phänomen wird durch die Polarisierung der A818-6-Zellen in der „hollow sphere“-Struktur erklärt (Lehnert et al., 2001d), belegt anhand entsprechender Untersuchungen zu Zelladhäsionsmolekülen, Mucin und Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) mittels Immunzytochemie und Elektronenmikroskopie. Neben der Begutachtung der Morphologie wurde auch diese Fähigkeit zur Adhärenz als charakteristisches Merkmal der Polarisierung getestet. Entsprechend wurde auch die Adhärenz der Sphäroide der transduzierten A818-4-Zellen untersucht, die jedoch unverändert zur Leervektor-Kontrolle war. Keine der Epimorphin-Isoformen und auch keine Epimorphin-Isoform-Kombination konnte nach den erzielten Ergebnissen die Morphogenese der A818-4-Zellen noch deren Polarisierung beeinflussen (**Abbildung 14**, **Abbildung 15** und **Abbildung 16**).

Auch in den transduzierten A818-6-Zellen konnte kein wesentlicher Unterschied in der „hollow sphere“-Entwicklung infolge der Überexpression einer Epimorphin-Isoform nachgewiesen werden (**Abbildung 17**). Vermutlich ist Epimorphin zwar notwendig, um die „hollow sphere“-Entwicklung zu vollziehen, aber eine Überexpression liefert der Zelle keinen weiteren Vorteil.

Demnach ist anzunehmen, dass entweder Epimorphin nicht alleine die Induktion der Morphogenese übernimmt, oder es fehlt den A818-4-Zellen der entsprechende Rezeptor oder die zur Signal-

übertragung notwendigen Mediatoren. Bisher wurde jedoch noch kein Epimorphin-Rezeptor beschrieben und auch die Signalwege sind weitestgehend unerforscht. Da die Überexpression der monomeren Epimorphin-Isoformen nicht zu einer gesteigerten Komplexbildung führte und die Zellen immunzytochemisch keine eindeutigen Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen, wenn der neutralisierende Epimorphin-Antikörper (MC-1) zur Detektion eingesetzt wurde, könnte das Problem im Fehlen eines für die Komplexbildung essentiellen Faktors liegen.

Die daraufhin durchgeführten Kokultur-Experimente mit mesenchymalen und A818-6-Zellen sollten den A818-4-Zellen noch weitere Faktoren zur Verfügung stellen.

4.2.5. Kokultur-Experimente

Die Kokultivierung der Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen erfolgte entweder untereinander, mit mesenchymalen Zellen (KIF-5-Fibroblasten) oder mit der lumenbildenden Zelllinie A818-6 (**Abbildung 18** und **Abbildung 19**).

Welche Epimorphin-Isoform für die morphoregulatorische Funktion verantwortlich ist, oder ob es Kombinationen aus mehreren Isoformen sind, blieb in den bisherigen Publikationen unbeantwortet. Diese Kokultivierungs-Experimente mit A818-4-Zellen, die unterschiedliche Epimorphin-Isoformen überexprimieren, sowie die Mehrfach-Transduktanten sollten Aufschluss über die Wirkung von Epimorphin-Kombinationen auf die Morphogenese geben.

Des weiteren wurde zur Unterstützung der Morphogenese die mesenchymale Zelllinie KIF-5 mit den transduzierten A818-4-Zellen kokultiviert. Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass diese mesenchymale Zelllinie einen stimulierenden Einfluss auf die A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung ausübt, sowohl was die Entwicklungsdauer als auch die Größe der „hollow spheres“ betrifft (Lehnert et al., 2001d). Aber auch im Allgemeinen sind epitheliale-mesenchymale Interaktionen gerade bei der epithelialen Morphogenese oder der pankreatischen Organogenese von Bedeutung (Gittes et al., 1996); (Ekblom et al., 1994); (Hirai et al., 1992).

Die Kokultur-Experimente von Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen mit A818-6-Zellen dienten dazu, den A818-4-Zellen weitere Faktoren, die für die „hollow sphere“-Bildung bedeutend sein könnten, zu liefern.

Bei den durchgeführten Kokultur-Experimenten ist zu unterscheiden, ob ein interzellulärer Kontakt oder lediglich der Austausch von löslichen Faktoren gegeben ist. Bei der Kokultivierung mit interzellulärem Kontakt zwischen den beiden Zelllinien wurden entweder schon ausgebildete A818-4-Sphäroide auf einen konfluenten KIF-5-Fibroblasten- bzw. A818-6-„monolayer“ ausgesät, oder die Zellen wurden 1:1 gemischt und gemeinsam ausgesät, wobei bei Letzterem eine Zelllinie mit dem Gen codierend für das grünfluoreszierende Protein EGFP transduziert war.

Die Aussaat der schon ausgebildeten Sphäroide auf einen „monolayer“ hatte den Vorteil, dass mögliche Veränderungen infolge der Transduktion des EGFP-Gens ausgeschlossen werden konnten. Des weiteren konnten mit dieser Methode zusätzlich Aussagen über die Adhärenz der Sphäroide

gemacht werden sowie über deren Potential, den „monolayer“ zu verdrängen. Ein möglicher Nachteil hingegen ist, dass der Zell-Zellkontakt zwischen „monolayer“ und Sphäroid nur innerhalb eines kleinen Bereichs stattfindet. Wurden die Zellen vor der Aussaat miteinander vermischt, konnte theoretisch ein unipolarer Zell-Zell-Kontakt stattfinden. Außerdem konnten die mesenchymalen Zellen zu Beginn der Sphäroid-Bildung auf die A818-4-Zellen Einfluss nehmen bzw. in die Struktur integriert werden.

Demnach ermöglichen diese beiden Kokultur-Methoden eine Differenzierung zwischen Effekten, die von der Kultivierung, entweder 2D oder 3D, der zweiten Zelllinie abhängen.

Welche Bedeutung der Zell-Zell-Kontakt hat, oder ob lediglich sezernierte Faktoren wichtig sind, wurde schließlich durch den Einsatz von Transwells, in denen nur ein Austausch von löslichen Faktoren stattfinden kann, und auch von konditioniertem Medium, geklärt.

Das Ergebnis der morphologischen Untersuchungen in den durchgeführten Kokultorexperimenten ist, dass die Morphologie der Epimorphin- überexprimierenden A818-4-Sphäroide im Vergleich zur Leervektorkontrolle keinen nachhaltigen Unterschied zeigte.

Dass Epimorphin auch die Polarität der Sphäroidzellen nicht beeinflusste, zeigten die Kokultur-Experimente von Sphäroiden auf dem KIF-5-Fibroblasten-„monolayer“, wo sie bereits nach einem Tag adhärten und schließlich wieder als „monolayer“ wuchsen.

Auch daraus lässt sich schließen, dass Epimorphin alleine keinen morphoregulatorischen Einfluss auf die Zelllinie A818-4 nimmt. Die Möglichkeit, dass weitere Mediatoren für die Wirkung von Epimorphin benötigt werden, aber der Zelllinie A818-4 fehlen, können durch die Kokultur-Experimente nicht ausgeschlossen werden. Aber es sind wohl keine löslichen Faktoren, die von A818-6 oder KIF-5-Fibroblasten sezerniert werden und auch keine von ihnen exprimierte Oberflächenmoleküle, die alleine für die Signalvermittlung von Epimorphin verantwortlich sind.

Die Kokultivierung der Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen (nicht gezeigt) erfolgte untereinander und mit den KIF-5-Fibroblasten. Es sollte dabei untersucht werden, ob durch Epimorphin-Überexpression eine Veränderung der „hollow sphere“ Entwicklung erzielt werden kann. Es konnte jedoch durch Epimorphin keine Änderung reproduzierbar festgestellt werden.

Aufgrund der fehlenden morphologischen Effekte durch die Überexpression der Epimorphin-Isoformen wäre das Ausschalten bzw. die Herunterregulation der Epimorphin-Expression durch z. B. siRNA in den A818-6-Zellen eine weitere interessante Möglichkeit, um Aussagen über die Funktion von Epimorphin in der „hollow sphere“-Entwicklung zu erhalten. Diese Experimente wurden aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

4.2.6. Untersuchungen zur Proliferation und Zellzyklus-Analysen

Es konnte entgegen (Oka und Hirai, 1996); (Hirai et al., 1998) anderer aber auch übereinstimmend (Fritsch et al., 2002) mit anderen Daten aus der Literatur kein deutlicher Einfluss von Epimorphin auf die Proliferation der A818-4- oder A818-6-Zellen festgestellt werden (**Abbildung 22**, **Abbildung 23** und **Abbildung 24**). Es konnte lediglich in Abwesenheit von FCS eine leichte prozentuale Zunahme der Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, in den Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen verzeichnet werden (**Abbildung 24**). Die Westernblot-Daten zur Expression von Zellzyklus-relevanten Proteinen korrelieren in A818-4 und A818-6 (**Abbildung 20**). Anhand derer ist der Epimorphin-Isoform II tendenziell eine eher antiproliferative Wirkung zuzuschreiben. Obwohl der Proteingehalt des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors $p27^{KIP1}$ bei den Epimorphin-Isoform II-Transduktanten leicht erhöht ist, konnte jedoch keine Inaktivierung von MAP-Kinasen festgestellt werden (**Abbildung 21**), denn Erk1/2-Phosphorylierung nimmt entscheidenden Einfluss auf den Proteingehalt von $p27^{KIP1}$, indem es durch Phosphorylierung die Degradation fördert (Zhang und Liu, 2002). Wohingegen die A818-6-Zellen, die mit der DNA codierend für die Epimorphin-Isoform I transduziert waren, eine Abnahme des Phosphorylierungsstatus von p38 und Erk1/2 sowie der Expression von c-Myc aufwiesen. Wider Erwarten konnte bei den Epimorphin-Isoform I überexprimierenden Zellen keine Zunahme des $p27^{KIP1}$ -Gehalts detektiert werden. Demnach ist anzunehmen, dass hier noch weitere Signalwege eingreifen. Messina et al. (Messina et al., 2005) hat eine Verbindung zwischen Cadherin-Cadherin-Interaktionen, $p27^{KIP1}$ -Gehalt und der terminalen Differenzierung bei Myoblasten beschrieben. Konform zu dem befinden sich die Zellen in der „hollow sphere“-Struktur in einem lückenlosen Zellverband, was vermutlich eine Ursache für den hohen Protein-Gehalt von $p27^{KIP1}$ darstellt. Entgegen dem wurden die transduzierten Zellen als subkonfluenter „monolayer“ für den Nachweis von Zellzyklus-relevanten Proteinen eingesetzt. Die Zellen wurden dazu immer gezählt, ausgesät und nach zwei Tagen lysiert. Schwankungen in der Zelldichte als Ursache für die Unterschiede im $p27^{KIP1}$ -Gehalt sind damit auszuschließen. Demnach wäre der Epimorphin-Isoform II, die in sowohl A818-4 und A818-6-Zellen zu einer Erhöhung von $p27^{KIP1}$ führte, ein eher fördernder Einfluss auf die Differenzierung zuzusprechen.

4.2.7. Telomeraseaktivität

Die reduzierte Telomeraseaktivität in den Epimorphin-überexprimierenden Zellen (**Abbildung 25**), wie auch in den „hollow spheres“ vorzufinden, weist auf einen höheren Differenzierungsstatus der Epimorphin-Transduktanten hin. Die Regulation der Telomeraseaktivität erfolgt meist über die Regulation der katalytisch aktiven Untereinheit hTERT ("human telomerase reverse transcriptase") des Ribonukleoproteins Telomerase. Die Modulation dieser Untereinheit kann z.B. durch den Transkriptionsfaktor c-Myc erfolgen, aber auch bcl-2 und $p21^{WAF1/CIP1}$ sind bekannte Regulatoren der Telomeraseaktivität (Mandal und Kumar, 1997); (Kallassy et al., 1998); (Liu, 1999). Auch Ceramiden

(z.B. C6-Ceramide) wurde eine inhibierende Wirkung auf die Telomeraseaktivität nachgesagt, die z.B. über eine Regulation der Sp1/Sp3-Funktion (Wooten und Ogretmen, 2005) oder über Modulation des c-Myc-Gehalts (Ogretmen et al., 2001) erfolgen kann. Die Abnahme der Telomeraseaktivität in Epimorphin-Isoform I-Transduktanten kann somit mit der Reduktion des c-Myc-Gehalts (**Abbildung 21**) in Assoziation mit einer gesteigerten Ceramid-Synthese (**Abbildung 29**) erklärt werden. Epimorphin-Isoform II-Transduktanten zeigen dagegen ein stärkeres Signal für p21^{WAF1/CIP1} (**Abbildung 20**) im Westernblot, das in Verbindung mit einer Reduktion der Telomeraseaktivität zu bringen ist.

4.2.8. Einfluss von Epimorphin auf pp60c-src

Die Tyrosinkinase pp60c-src gibt die Signale von Transmembranrezeptoren ins Zellinnere weiter. Die Aktivierung von pp60c-src bringt verschiedene zelluläre Konsequenzen mit sich, wie z.B. morphologische Veränderungen (Warren et al., 1988), Zellproliferation (Kitanaka et al., 1994); (Waki et al., 1994); (Tamura et al., 1984) oder terminale Differenzierung (Mellstrom et al., 1987); (Cartwright et al., 1987); (Barnekow und Gessler, 1986). Des weiteren wurde in mehreren Publikationen dem pp60c-src eine wichtige Rolle in der Regulation der Funktion synaptischer Vesikel zugeschrieben, da es erstens in neuronalem Gewebe in besonders hohen Mengen vorhanden ist (Zhao et al., 2000); (Brugge et al., 1985), zweitens wurde basierend auf immunzytochemischen Untersuchungen gezeigt, dass die Lokalisation von pp60c-src mit der von Markern für synaptische Vesikel überlappt (Linstedt et al., 1992a) und drittens konnten auch Membranproteine synaptischer Vesikel, wie Synaptophysin (Barnekow et al., 1990)), Synaptogyrin und Cellugyrin (Janz und Sudhof, 1998) als pp60c-src-Substrate identifiziert werden, was die Hypothese, dass pp60c-src die Exocytose bzw. auch Sekretion beeinflusst, stützt (Ely et al., 1994).

In A818-4-Zellen bewirkten alle drei Epimorphin-Isoformen eine Erhöhung des Protein-Gehalts von pp60c-src, während erstaunlicherweise in A818-6-Zellen lediglich die Epimorphin-Isoform I und III diese Wirkung aufwiesen (**Abbildung 33**). Aufgrund von Daten aus RT-PCR-Analysen ist jedoch auszuschließen, dass die Regulation von pp60c-src infolge der Epimorphin-Überexpression auf Transkriptionsebene zu suchen ist, da der mRNA-Gehalt in allen Transduktanten unbeeinflusst blieb. Über die Regulation der Expression und Degradation von pp60c-src ist jedoch nur wenig bekannt.

Neben der Zunahme des Gesamtproteingehalts von pp60c-src, erhöht sich auch der phosphorylierte Anteil, wobei hier anzunehmen ist, dass es sich dabei um Autophosphorylierung sowohl an Position Tyrosin 418 als auch an Position Tyrosin 529 handelt, da das Verhältnis von Gesamtprotein zu phosphoryliertem Protein relativ ausgeglichen erschien (**Abbildung 36**). Immunzytochemische Untersuchungen zeigten zusätzlich, dass pp60c-src vornehmlich zytoplasmatisch in kompakten, vesikulären Strukturen vorzufinden ist, wo es eindeutig mit Epimorphin kolokalisiert vorliegt (**Abbildung 34**). Die Ko-Immunpräzipitation von Epimorphin I und II mit pp60c-src wies zusätzlich darauf hin, dass entweder eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen diesen Proteinen stattfindet

(**Abbildung 35**). Die kurze Epimorphin-Isoform III konnte hingegen nicht ko-immunpräzipitiert werden, was zeigt, dass lediglich das putativ membranständige Epimorphin mit pp60c-src interagiert. Da aber auch die Überexpression der Isoform III zu einer Zunahme des pp60c-src-Gehalts führte, ist anzunehmen, dass die Erhöhung von pp60c-src nicht durch Stabilisierung des Proteins infolge der direkten Komplexbildung mit Epimorphin hervorgerufen wird. Jedoch deuten diese Daten darauf hin, dass die Funktion der Epimorphin-Isoformen, die große Homologien zu den Vesikelproteinen Syntaxine aufweisen, tatsächlich auf Ebene des Vesikeltransports zu suchen ist und unterstützen Theorien, die die morphoregulatorische Funktion des Epimorphin mit der modulierenden Wirkung auf die Sekretion entsprechender Faktoren erklären. Sehr wahrscheinlich spielt Epimorphin auch in der Form eine Rolle, als dass es die Polarisierung von Epithelzellen ermöglicht, da, wie bereits in der Einleitung beschrieben, Syntaxine den Zielort der Vesikel mitbestimmen und so für den kontrollierten Transport von Proteinen zu ihren Bestimmungsorten mitverantwortlich sind. Das Protein pp60c-src scheint dabei ebenfalls eine Funktion einzunehmen, die auch für die „hollow sphere“-Entwicklung unerlässlich ist. Zwar kann keine gesteigerte Expression oder Aktivierung von pp60c-src im Verlauf der „hollow sphere“-Bildung nachgewiesen werden (nicht gezeigt), jedoch wird die Lumenbildung durch Inhibierung von pp60c-src mit Herbimycin A konzentrationsabhängig blockiert (**Abbildung 37**).

4.2.9. Apoptose

Die Epimorphin-Isoform I und III überexprimierenden A818-6-Zellen zeigten bereits ohne Stimulation eine Zunahme der Zellen in der SubG1-Phase (**Abbildung 26**). PARP-Spaltung (nicht gezeigt) sowie der Nachweis von M30-positiven Zellen deuten auf eine Caspase-abhängige Apoptose hin.

Nach Induktion durch Anti-CD95 wurde ebenfalls eine höhere Apoptosesensitivität in Epimorphin-Isoform I und III transduzierten A818-6-Zellen gezeigt. A818-6EpiII verhielt sich nach Anti-CD95-Induktion sogar resistenter als die Leervektorkontrolle.

Um der Ursache der gesteigerten Sensitivität auf die Spur zu kommen, wurde zunächst die Expression von CD95 (Fas-Rezeptor) in den Epimorphin-Transduktanten untersucht, die sowohl bei der Leervektor-Kontrolle als auch in den Transduktanten um die 60 % betrug und damit unbeeinflusst von Epimorphin blieb.

Westernblot-Analysen von pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie korrelierten mit der geringeren Apoptosesensitivität. Bcl-2 und Bcl-xL sind integrale Membranproteine, die u. a. auf der Mitochondrienmembran zu finden sind (Hockenbery et al., 1990) und dort antiapoptotische Funktionen ausüben, indem sie der Cytochrom C -Freisetzung entgegenwirken (Shimizu et al., 1996); (Marzo et al., 1998); (Skulachev, 1998). In den Epimorphin-Isoform II-Transduktanten war ein höherer Bcl-2-Gehalt evident. Bcl-xL hingegen war in den Epimorphin-Isoform I und III überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Leervektorkontrolle reduziert. Diese Differenz wurde im Verlauf der Anti-CD95 (CH11)-Inkubation ausgeglichen (**Abbildung 27**). Möglicherweise ist das

Phänomen damit zu erklären, dass zur Lysatherstellung lediglich die noch adhärennten Zellen eingesetzt wurden. Die Anti-CD95-Inkubation führte vermutlich zur ungewollten Selektion der Zellen, wobei die apoptoseresistenteren Zellen – mit höherer Bcl-xL-Expression – innerhalb der 18stündigen Inkubationszeit angereichert wurden.

Bid ist ein proapoptotisches Protein, welches im ungespaltenen Zustand im Zytosol vorkommt. Das Spaltprodukt transloziert in die Mitochondrienmembran und verursacht dort die Freilassung von Cytochrom C (Gross et al., 1999), welches sich dann mit dem Protein Apaf-1, der Procaspase-9 und dATP zum Apoptosom zusammenschließt (Li et al., 1997); (Hu et al., 1999); (Zou et al., 1999); (Purring-Koch und McLendon, 2000).

Nach 18stündiger Anti-CD95-Behandlung der Zellen war eine deutliche Zunahme der Bid-Spaltung (bis zu ca. 80 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle) in den Epimorphin-Isoform I und III-transduzierten A818-6-Zellen zu erkennen (**Abbildung 27**), was für eine gesteigerte Caspase 8-Aktivität spricht (Li et al., 1998); (Yamada et al., 1999).

Was zur dieser erhöhten Caspase 8-Aktivität führte, kann nur gemutmaßt werden. Es gibt jedoch einen Hinweis, dass Metaboliten des Sphingolipid-Stoffwechsels eine Rolle spielen könnten. So zeigte sich, dass in den Epimorphin-Isoform I und III überexprimierenden A818-6-Zellen eine Abnahme der aktiven Sauren Ceramidasen zu verzeichnen ist, was in dem Ausmaß bei den A818-4-Transduktanten nicht auftrat (**Abbildung 28**). Die Reduktion der aktiven sauren Ceramidase könnte zu einem Anstieg von Ceramiden führen, da theoretisch weniger Ceramid abgebaut wird. Für die Epimorphin-Isoform I konnte dies auch durch die Bestimmung des Ceramid-Gehalts in den A818-6-Transduktanten bestätigt werden (**Abbildung 29**). Ceramide können die Aktivierung von Caspase 8 und auch von Caspase 3 induzieren und damit den Apoptoseprozess einleiten (Grulich et al., 2000); (Kondo et al., 2000); (Sawada et al., 2002); (Darios et al., 2003); (Lin et al., 2004). Da auch Caspase 3-Aktivierung zur Spaltung von Bid führen kann, könnte auch dies die Ursache der gesteigerten Bid-Spaltung sein (Degli et al., 2003).

4.2.10. Einfluss von Epimorphin auf Ceramide

Die Westernblot-Analysen zeigten eine Abnahme der aktiven Untereinheit der Sauren Ceramidasen in Epimorphin-Isoform I- und III-transduzierten A818-6-Zellen (**Abbildung 28**), diese katalysieren die Hydrolyse von Ceramiden und tragen damit maßgeblich zur Modulation des Ceramid-Gehalts bei. Dies könnte ein Hinweis auf Membranzustandänderungen infolge der Epimorphin-Überexpression sein, was z.B. auch im Verlauf der Zellpolarisierung stattfindet.

Ceramide sind wie schon eingangs erwähnt Bestandteile von Zellmembranen und spielen zusätzlich eine wichtige Rolle als „second-messenger“, die diverse Signalwege beeinflussen können. Eine Abnahme der Sauren Ceramidasen deutet auf einen gesteigerten Ceramidgehalt hin, was für die A818-6EpiI-Zellen, nicht jedoch für die A818-6EpiIII-Zellen, bestätigt werden konnte. Demnach ist anzunehmen, dass in den A818-6EpiIII-Zellen noch andere regulatorische Faktoren, die die Abnahme

der sauren Ceramidase wieder ausgleichen, eine Rolle spielen. Neben der Ceramid-Hydrolyse durch Ceramidasen hängt der Ceramid-Gehalt einer Zelle auch von der Aktivität der Enzyme ab, die beteiligt sind an der *de-novo*-Synthese oder dem Sphingomyelin-Abbau (Sphingomyelinasen).

Ceramide können in einigen Zellen, bisher beschrieben für humane Melanocyten (Kim et al., 2002), kortikale Neuronen (Willaime et al., 2001) und HEK 293-Zellen (Bourbon et al., 2001), eine Reduzierung in der Erk1/2-Phosphorylierung bewirken. Dieses kann, wie für HEK 293-Zellen beschrieben, über PKCs erfolgen. Übereinstimmend zu diesen genannten Publikationen konnte auch in den A818-6EpiI-Zellen eine Abnahme der Erk1/2-Aktivierung als auch ein reduzierter c-Myc-Gehalt beobachtet werden (**Abbildung 21**).

In einigen Publikationen wurde der Einfluss der sauren Ceramidase auf die Apoptoserate beschrieben, indem sie den Ceramidgehalt der Zellen moduliert (Strelow et al., 2000). Da der Proteingehalt der aktiven Untereinheit der sauren Ceramidase mit der Apoptosesensitivität der Epimorphin-Transduktanten korrelierte, ist anzunehmen, dass die Ursache im Bereich der Sphingolipide zu suchen ist.

4.3. „hollow sphere“-Entwicklung

4.3.1. Apoptose während der „hollow sphere“-Entwicklung

Lumenbildung durch Apoptose ist ein gängiger Mechanismus in der Morphogenese während der embryonalen Entwicklung (Harmon et al., 1984). In verschiedenen Studien konnte auch *in-vitro* unter 3D-Kulturbedingungen eine Lumenbildung als Folge der Apoptose gezeigt werden (Lin et al., 1999); (Sunil et al., 2002); (Peters et al., 2002); (Debnath et al., 2002). Die zugrunde liegenden Mechanismen für die Auslösung des programmierten Zelltods während der Morphogenese sind heterogen und meist noch nicht vollständig geklärt. Debnath et al. (Debnath et al., 2002) beschrieb eine durch Apoptose ausgelöste Lumenbildung in Brustdrüsen-Zellen in der *in-vitro*-3D-Kultur, die jedoch durch Überexpression von antiapoptotischen Proteinen, wie Bcl-2, nicht blockiert werden konnte. Lediglich eine Koexpression von proliferationsstimulierenden sowie antiapoptotischen Onkogenen führte letztlich zu einer Inhibierung der Lumenbildung. In einer weiteren Publikation wurde dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1-4S eine Schlüsselfunktion in der Morphogenese der Brustdrüse eingeräumt. Die sonst CEACAM1 negative Mammakarzinomzelllinie MCF7 entwickelte unter 3D-Kulturbedingungen wieder einen normalen Phänotyp⁷ nach Transfektion mit CEACAM1-4S. Die durch CEACAM1-4S hervorgerufene Lumenbildung erfolgte über eine Caspase-abhängige Apoptoseinduktion der zentralen Zellen. Die in Anwesenheit des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk (50 µM) führte jedoch nur zu einer ca. 20 %igen Abnahme der lumenbildenden Aggregate (Kirshner et al., 2003).

⁷ der normale Phänotyp ist charakterisiert u.a. durch ein zentrales Lumen

In dem A818-System wurde mittels M30-Färbung⁸ gezeigt, dass im Gegensatz zur nicht-lumenbildenden Zelllinie A818-4, A818-6 vermehrt apoptotische Zellen im Innern der Zellaggregate aufweist (**Abbildung 43**). Weiterhin offenbarte eine PARP-Spaltung das Vorhandensein von apoptotischen Prozessen während der A818-6-„hollow sphere“-Entwicklung (**Abbildung 44**). Um zu klären, inwieweit die Apoptose zentraler Zellen die Lumenbildung beeinflusst, wurde die Wirkung des pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk (**Abbildung 45**) und des Caspase-Inhibitors III (nicht gezeigt) auf die „hollow sphere“-Entwicklung getestet. Beide Inhibitoren führten nicht zur Blockierung der Lumenbildung. Die M30-Färbung von zVAD-fmk-behandelten A818-6-Aggregaten zeigte jedoch eine effiziente Inhibierung der Cytokeratin 18-spaltenden Caspasen (**Abbildung 46**).

Die Möglichkeit einer Caspase-unabhängigen Apoptose, wie z. B. über Autophagie oder Cathepsine, wurde durch den Einsatz entsprechender Inhibitoren untersucht. Sowohl Autophagie als auch eine Aktivierung von Cathepsin wurde bereits in Zusammenhang mit einer Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen Apoptose gebracht (Heinrich et al., 2004); (Daido et al., 2004); (Scarlati et al., 2004). Aufgrund der hemmenden Wirkung des Sphingomyelinase-Inhibitors Desipramin auf die „hollow sphere“-Entwicklung schienen auch diese Ceramid-vermittelten Mechanismen in dem A818-6-System von Bedeutung zu sein. Jedoch konnte weder durch Inhibition der Autophagy durch 3-Methyladenin⁹ noch durch Hemmung des Cathepsin B eine Reduktion der Lumenbildung erzielt werden (**Abbildung 47**).

Diese Daten führen zur Annahme, dass eine Caspase-abhängige Apoptose während der „hollow sphere“-Entwicklung zwar stattfindet, diese jedoch nicht die Ursache der Lumenbildung in dem A818-6-System darstellt.

4.3.2. CEACAM1

Das Calcium-unabhängige Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 wurde in dem A818-System näher betrachtet. Unser Augenmerk fiel auf dieses Molekül, da dessen Abnahme ein wichtiger Schritt in der malignen Transformation ist. Sowohl im Colon- als auch im Prostata-Karzinom kommt es zu einem Verlust oder zu einer Reduktion der CEACAM1-Expression (Neumaier et al., 1993); (Hsieh et al., 1995). Durch Transfektion der langen Isoform des CEACAM1, CEACAM1-L, in Colon- oder Prostata-Karzinomzellen konnte deren Tumorigenität *in-vitro* und *in-vivo* signifikant supprimiert werden (Hsieh et al., 1995); (Kunath et al., 1995). Außerdem scheint es an morphoregulatorischen Prozessen beteiligt zu sein, da durch Rekonstitution von CEACAM1-4S in der Mammakarzinomzelllinie (MCF7) wieder der normale Phänotyp erzeugt werden konnte (Kirshner et al., 2003). In Anlehnung an diese Publikation wurde die CEACAM1-Expression in den A818-6-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Phänotyp („monolayer“ vs. „hollow spheres“) untersucht. Die

⁸ Caspase-Spaltprodukt des Cytokeratin 18

⁹ blockiert die Bildung von autophagischen Vakuolen

Westernblot-Daten zeigten tendenziell eine leichte Zunahme von CEACAM1 in der „hollow sphere“-Struktur (**Abbildung 41**). Im Gegensatz dazu schien es, in der nicht-lumenbildenden Zelllinie A818-4 eher zu einer Abnahme der CEACAM1-Expression in der Sphäroid-Struktur zu kommen. Diese Beobachtung ist demnach konform zur Annahme, dass die A818-6-Zellen in der „hollow sphere“-Struktur einen höheren Differenzierungsstatus einnehmen als der korrespondierende „monolayer“ bzw. die Zelllinie A818-4 unter 2D- bzw. 3D-Kulturbedingungen. Die immunzytochemischen Untersuchungen offenbarten eine andere Lokalisation von CEACAM1 in den A818-6 „hollow spheres“ als im korrespondierenden „monolayer“ oder auch als in den A818-4-Sphäroiden. Während im A818-6 „monolayer“ und in den A818-4-Sphäroiden die CEACAM1-Verteilung eher ein diffuses Bild ergab, konnte in den A818-6 „hollow spheres“ eine strikt apikale/laterale Lokalisation von CEACAM1 gezeigt werden. Diese Beobachtung entspricht ebenfalls denen aus anderen Studien (Kirshner et al., 2003), (Sundberg und Obrink, 2002). Im Unterschied zu den MCF7-Zellen, deren apikale Seite in Matrigel zum Lumen zeigt, weist die apikale Seite der A818-6 „hollow spheres“ zum Medium. Diese „inside-out“-Orientierung der „hollow spheres“ könnte mit der 3D-Kultivierungsmethode zusammenhängen, was den direkten Vergleich zum MCF7-System erschwert. Die morphoregulatorische Funktion von CEACAM1-4S in dem MCF7-System liegt in der Induktion apoptotischer Prozesse in den zentralen Zellen, was die Bildung eines zentralen Lumens zur Folge hat. Ähnliches wurde bereits für die normale Brustepithelzelllinie MCF10F beschrieben. Diese exprimieren CEACAM1 und bilden unter 3D-Kulturbedingungen ein durch Apoptose erzeugtes Lumen aus, was durch „antisense“ CEACAM1 oder in Anwesenheit eines CEACAM1-neutralisierenden Antikörpers reduziert wurde (18 % bei einer Ak-Konzentration von 100 µg/ml) (Huang et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnte im A818-6 „hollow sphere“-System keine Auswirkung auf die Lumenbildung in Anwesenheit verschiedener CEACAM1-Antikörperkonzentrationen beobachtet werden (**Abbildung 42**). Demnach ist anzunehmen, dass die Funktion des CEACAM1 in dem A818-6 „hollow sphere“-System auf einer anderen Ebene zu suchen ist als auf der der Apoptoseinduktion.

4.3.3. An der „hollow sphere“-Entwicklung beteiligte Signalwege

Anhand der zeitlichen Serienaufnahmen während der „hollow sphere“-Entwicklung ist zu erkennen, dass im Laufe dieser Entwicklung die „hollow spheres“ in ihrer Größe zunahmen, was durch Proliferation oder morphologische Änderungen der äußeren Zellen zustande kommen könnte. Vorhergehende Experimente zeigten zumindest für reife „hollow spheres“ eine deutliche Abnahme der Proliferation im Vergleich zum A818-6 „monolayer“. Zusätzlich wurde dieses noch unterstützt durch den Nachweis einer geringeren Telomerase- sowie MAP-Kinase-Aktivität (Lehnert et al., 2001b); Diplomarbeit J. v. Böttcher).

Des weiteren scheinen die äußeren Zellen eine flachere Morphologie anzunehmen, wodurch sich das Oberflächen/Volumen-Verhältnis stark vergrößert. Daraus würde ebenfalls eine Größenzunahme der

„hollow spheres“ resultieren. Diese Zellmorphologie innerhalb der „hollow sphere“-Struktur könnte z.B. passiv über die basale Sekretion von Stoffen ins Lumen erfolgen, wodurch die Zellen quasi gedehnt würden infolge des Innendrucks. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die Zellen aktiv ihre Morphologie durch Umorganisation ihres Zytoskeletts beeinflussen.

Bisher sind die an der „hollow sphere“-Entwicklung beteiligten Signalwege weitestgehend unbekannt. Um etwas Licht ins Dunkel zu bringen, wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die „hollow sphere“-Bildung untersucht.

4.3.3.1. MAP-Kinase-Signalwege

Aus vorhergehenden Daten ist bekannt, dass A818-6 „hollow spheres“ im Vergleich zum korrespondierenden „monolayer“ eine Abnahme in der Erk1/2-Phosphorylierung aufweisen (Diplomarbeit von J. von Bötticher). Diese Abnahme erfolgt trotz konstitutiv aktivem K-Ras in den A818-6-Zellen. Demnach ist evident, dass weitere Signalwege inhibierend in den MAP-Kinase-Signalweg eingreifen, die infolge der 3D-Kultivierung induziert werden. Welche Signalwege hier eine Rolle spielen, ist noch völlig unbekannt.

In Tumoren ist eine konstitutive Aktivierung des Erk-Signalwegs meist an der Induktion der Zellproliferation beteiligt (Black et al., 2000). Man vermutet, dass eine hohe p38-Aktivität als Negativregulator für die Proliferation fungiert, indem es die Erk-Aktivierung inhibiert (Singh et al., 1999); (Chen et al., 2000); (Aguirre-Ghiso et al., 2001). Eine persistierende Suppression der Proliferation („dormancy“) von malignen humanen Karzinomzellen (HEp3) konnte durch eine Erhöhung der Phospho-p38/Phospho-Erk-Ratio erzielt werden (Aguirre-Ghiso et al., 2001).

Um zu untersuchen, ob in dem A818-6-System auch eine gesteigerte p38-Aktivierung der interagierende Faktor ist, wurden Westernblot-Analysen zur Detektion der p38-Aktivierung in Abhängigkeit von der „hollow sphere“-Struktur durchgeführt. Diese wiesen allerdings zusätzlich zur Reduktion der Erk-Aktivierung eine Abnahme von Phospho-p38 in den „hollow spheres“ auf (**Abbildung 48**). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die Regulation der Erk-Aktivierung unter 3D-Kulturbedingungen nicht die Folge einer Zunahme von Phospho-p38 darstellt, wie in dem Tumordormancy-Modell von Aguirre-Ghiso beschrieben.

Zusätzlich sollte der Einsatz entsprechender Inhibitoren gegen den p38- und MAP-Kinase-Signalweg Aufschluss über dessen Einfluss auf den Entwicklungsprozess der „hollow spheres“ liefern. Es zeigte sich, dass weder die Inhibition des MAP-Kinase-Signalwegs eine „hollow sphere“-Entwicklung förderte noch kam es zu einer Verschlechterung infolge des Einsatzes eines p38-Inhibitors. Die Entwicklung der „hollow spheres“ verlief in Anwesenheit dieser Inhibitoren völlig unverändert im Vergleich zur Kontrolle (**Abbildung 48**). Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass eine p38-Aktivierung für die „hollow sphere“-Entwicklung nicht verantwortlich ist. Die unveränderte Entwicklung in Anwesenheit des MAP-Kinase-Inhibitors lässt dagegen vermuten, dass die

Lumenbildung und die Größe der „hollow spheres“ weitestgehend unabhängig von proliferierenden Zellen innerhalb der „hollow sphere“-Struktur sind.

4.3.3.2. Proteinkinase C (PKC)

PKCs regulieren die Aktivität nachgeordneter Enzyme oder Faktoren durch deren Phosphorylierung an Serin- oder Threonengruppen. Bisher sind 12 Isoenzyme der PKCs bekannt, die abhängig von ihrem Aktivierungsweg unterschieden werden in:

1. „classic“ PKC (cPKC):
Sie werden durch die Ca^{2+} -Ionen als "second messenger" und Diacylglycerin aktiviert. Zu ihnen gehören die Isoformen PKC α , PKC β I, PKC β II und PKC γ .
2. „novel“ PKC (nPKC):
Diese Gruppe der PKCs wird nur durch Diacylglycerin aktiviert. PKC ϵ , PKC δ und PKC η gehören der nPKCs bei.
3. „atypical“ PKC (aPKC):
Ihre Aktivierung verläuft Ca^{2+} -Ionen- und Diacylglycerin-unabhängig. Die Gruppe besteht aus PKC ξ , PKC λ /I und PKC μ .

Wichtige Zielproteine, die von den PKCs aktiviert werden, liegen gekoppelt über ein Lipidmolekül an der Zellmembran, von wo aus sie in diverse physiologische Prozesse, wie Zellmotilität, Membrantransport, Sekretion und Proliferation regulierend eingreifen.

Je nach Aktivierungsmodus erfolgt eine Translokation der entsprechenden PKCs aus dem Cytosol an die Membran bestimmter Kompartimente in die Nähe ihrer Zielproteine.

Der Inhibitor Gö6983 hemmt in der Konzentration von 100 nM alle PKCs, außer der atypischen PKC-Isoform PKC μ oder PKD. Die A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung wurde in Anwesenheit von 100 nM Gö6983 getestet. Diese Inhibitor-Konzentration vermochte keine Veränderung in der Entwicklung hervorzurufen. Mit einer Gö6983-Konzentration von 20 μM wird auch die Isoform PKC μ inhibiert. Wird der Inhibitor in dieser Konzentration direkt nach Aussaat der A818-6-Zellen hinzugegeben, so entwickeln sich statt der „hollow spheres“ sehr kompakte Sphäroide (**Abbildung 49**). Gibt man den Inhibitor erst nach Ausreifung der „hollow spheres“ hinzu, so führt dies zu einem schleichenden Zusammenfall der Struktur (**Abbildung 50**). Die Aktivierung über PKC μ scheint somit für die Ausbildung der Struktur entscheidend und auch langfristig für die Aufrechterhaltung der Struktur von Bedeutung zu sein. Die Behandlung von adhären A818-6 „monolayer“-Zellen mit dem Inhibitor für 24 Stunden führte hingegen zu keinen morphologischen Auffälligkeiten, wie auch die Aktinfärbung gezeigt hat.

Die Zellzyklus-Analyse zeigte, dass der Inhibitor keinen wesentlichen Einfluss auf Zelltod oder Proliferation ausübte. Immunzytochemische Untersuchungen an Gö6983-behandelten A818-6-Sphäroiden offenbarten allerdings eine für „hollow spheres“ untypische Zellanordnung mit stark diffuser ZO-2-Färbung, verbunden mit fehlender apikaler CEACAM1-Lokalisation, was auf einen

Verlust der Polarität in der „hollow sphere“-Struktur schließen lässt (**Abbildung 53**). Es wurde bereits in vielen Publikationen beschrieben, dass atypische PKCs auf verschiedene Weise eine kritische Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung der apiko-basalen Zellpolarität einnehmen (Chalmers et al., 2005); (Rolls et al., 2003), die häufig mit einer Komplexbildung der „atypical“ PKCs mit unterschiedlichen Par-Proteinen¹⁰ (z.B. Par6) assoziiert ist (Cau und Hall, 2005); (Macara, 2004); (Henrique und Schweisguth, 2003). Demzufolge ist anzunehmen, dass auch während der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung vergleichbare Prozesse, in denen insbesondere die PKC μ -Isoform beteiligt ist, eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Differenzierungsvorgänge spielen. Um hier genauere Aussagen geben zu können, erfordert es jedoch noch weitere Untersuchungen, auch hinsichtlich der Par-Proteine.

Weiterhin ist PKC μ auch wichtig für die Regulierung des Protein-Transports vom trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran (Liljedahl et al., 2001), (Ghanekar und Lowe, 2005), was ebenfalls die Aufhebung der Zellpolarität nach der Gö6983-Behandlung erklären könnte.

Die destruktive Wirkung des spezifischen PKC δ -Inhibitors Rottlerin auf „hollow spheres“ (**Abbildung 49** und **Abbildung 50**) ist ganz eindeutig mit dem Zerfall des Zytoskeletts zu erklären (**Abbildung 52**). Als Folge daraus verlieren die Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte und sind schließlich vermehrt als Einzelzellen zu finden. Eine E-cadherin-Internalisierung durch Rottlerin wurde bereits in humanen Keratinozyten beobachtet (Dietrich et al., 2001). Da mit einer Konzentration von 100 nM Gö6983 (Inhibitorkonzentration für alle PKCs, außer PKC μ) kein Effekt auf die „hollow sphere“-Entwicklung zu erkennen war, scheint die Wirkung von Rottlerin nicht wirklich PKC δ -spezifisch zu sein.

4.3.3.3. Sphingomyelin-Metaboliten

Auf verschiedene Stimuli reagieren Zellen mit der Metabolisierung von Sphingomyelin aus der zellulären Plasmamembran. Mit Hilfe von Sphingomyelinasen wird u. a. Ceramid gebildet, das wiederum durch Ceramidasen zu Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat hydrolysiert wird. Diese Metaboliten spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung, Onkogenese und Apoptose.

Während der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung kommt es im Vergleich zum korrespondierenden „monolayer“ zu einem drastischen Anstieg der katalytisch aktiven Untereinheit der sauren Ceramidase (**Abbildung 30**). Bei der nicht-lumenbildenden Zelllinie A818-4 konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden, was vermuten lässt, dass es sich hierbei nicht nur um eine Antwort auf die veränderte Kulturbedingung handelt. Vielmehr deutet es auf verstärkte Ab- und Umbau-Prozesse der Zellmembran hin, die vermutlich während der „hollow sphere“-Bildung infolge zunehmender

¹⁰ Par-Proteine zuerst entdeckt in *Caenorhabditis elegans*. Allgemein verantwortlich für die Regulation der Zellpolarität

Polarisierung und Differenzierung der Zellen stattfinden. Die Inhibition der sauren Ceramidase führte zu einer Verschlechterung der „hollow sphere“-Bildung, die gekennzeichnet war durch eine Blockierung der Lumenbildung (**Abbildung 32**).

Einen deutlicheren Effekt erhielt man, wenn die A818-6-Zellen in Anwesenheit eines Sphingomyelinase-Inhibitors (Desipramin) unter 3D-Kulturbedingungen inkubiert wurden (**Abbildung 32**). In dem Fall kam es zu einer nahezu 100 %igen Blockierung der Lumenbildung, die jedoch reversibel war. Wohingegen die Hemmung der *de-novo* Ceramidbiosynthese durch den Inhibitor Fumonisin B1 keinen Einfluss auf die „hollow sphere“-Entwicklung zu haben schien. Dieses unterstützt die Hypothese, dass die Ceramidgenerierung eine Folge des Sphingomyelin-Abbaus, katalysiert durch die Saure Sphingomyelinase, ist, während die *de-novo* Synthese von Ceramid in diesem Fall offensichtlich keine Bedeutung hat.

Da Ceramide in hohen Konzentrationen einen apoptosefördernden Einfluss auf viele verschiedene Zelllinien ausüben können (Barak et al., 2001); (Kurinna et al., 2004); (Takai et al., 2005), wurde zunächst auch hier angenommen, dass möglicherweise eine Erhöhung des Ceramidgehalts in den zentralen Zellen der initialen A818-6 Aggregate zur Apoptose-Induktion führte. Dies hätte auch die stetige Steigerung der Sauren Ceramidase erklärt, wenn man davon ausgegangen wäre, dass diese nur in den überlebenden äußeren Zellen aktiviert wird, während die Aktivierung in den zentralen Zellen ausbleibt. Da sich im zeitlichen Verlauf das Verhältnis von zentralen und äußeren Zellen jedoch zugunsten der Letzteren verschiebt, würde dies zu einer Zunahme der sauren Ceramidase führen. Jedoch zeigte sich, dass einerseits auch in Anwesenheit des Sphingomyelinase-Inhibitors unverändert M30-positive Zellen im Zentrum der A818-6-Aggregate zu verzeichnen waren (**Abbildung 46**). Andererseits konnten morphologische Unterschiede der äußeren Zellen infolge der Inhibitor-Behandlung festgestellt werden. Während die „hollow spheres“ im Verlauf ihrer Entwicklung an Größe zunehmen, die wie schon erläutert, nicht primär durch Zellproliferation zu erklären ist, verharteten die Desipramin-behandelten Aggregate fast in ihrem Ausgangsstadium (**Tabelle 3**). Entsprechend blieb die schon beschriebene morphologische Veränderung der äußeren Zellen von einer eher kuboiden zu einer flachen Zellform aus. Da bisher noch nicht geklärt ist, ob dies durch Umorganisation des Zytoskeletts oder passiv durch Erhöhung des Innendrucks infolge von Sekretionsprodukten im Lumen stattfindet, kann über die Wirkung des Inhibitors bzw. des Ceramids nur gemutmaßt werden.

Mehrere Ansatzpunkte sind denkbar:

I. Einfluss auf Zellpolarität:

Sphingolipide bilden zusammen mit Cholesterol Mikrodomänen in der Zellmembran, die sogenannten „lipid rafts“ (Brown und London, 2000), welche eine wichtige Funktion in der Protein-Sortierung und in deren Transport einnehmen (Simons und Ikonen, 1997). Sortierung und Transport von Proteinen sind eine grundlegenden Voraussetzung für die Bildung und Aufrechterhaltung von räumlicher und funktionaler Asymmetrie der Plasmamembran, die schließlich Zellpolarität ausmacht. Die Inhibition

des Sphingomyelin-Abbaus durch Desipramin und damit die Generierung von Ceramiden könnte möglicherweise auch die Ausbildung oder Zusammensetzung der „lipid rafts“ beeinflussen (Cremesti et al., 2002).

Die immunzytochemischen Untersuchungen deuteten jedoch darauf hin, dass die Desipramin-behandelten Zellen trotz der fehlenden Lumenbildung Polarität aufweisen. Gerade die ZO-2-Färbung wies sogar auf noch besser strukturierte Zell-Zell-Grenzen hin (**Abbildung 53**). Die Wirkung des Desipramins ist somit vermutlich nicht auf der Ebene der Differenzierungsinduktion zu suchen. Eher ist anzunehmen, dass nur die Ausbildung eines Lumens unterdrückt wird. Denkbar wäre zum Beispiel eine veränderte Membranzusammensetzung infolge der Behandlung von Desipramin, wodurch die Fluidität oder auch die Ladung beeinflusst werden, was wiederum Auswirkungen auf die Zellmorphologie haben könnte.

II. Einfluss auf die Sekretion:

Ceramide können die Sekretion verschiedener Moleküle beeinflussen. In CaCo-2-Zellen bewirkte ein Ceramid-Analogon die Abnahme der apo B-Sekretion und auch die Amylase-Sekretion von Pankreasazinus-Zellen konnte durch Ceramide inhibiert werden. Im Gegensatz dazu führten C8-Ceramide in Mikroglia-Zellen zu einer Induktion der Sekretion von „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF). Ob ein solcher Ceramid-abhängiger Sekretions-Mechanismus für die Lumenbildung der A818-6-„hollow spheres“ verantwortlich ist, könnte ein weiterer Gegenstand der zukünftigen Forschung sein.

III. Einfluss auf das Zytoskelett:

In einigen Publikationen wurde insbesondere dem Sphingolipid-Metabolit Sphingosin-1-Phosphat eine Rolle in der Umorganisation des Zytoskeletts zugeschrieben (Formigli et al., 2002); (Linz-McGillem et al., 2004); (Formigli et al., 2005); (Singleton et al., 2005). Da auch der Saure Ceramidase Inhibitor NOE die Lumenbildung blockiert, zwar weniger effizient, aber einen morphologisch vergleichbaren Effekt wie Desipramin ausübt, könnte auch diese Möglichkeit in Erwägung gezogen werden.

Zusammenfassung

Der Subklon A818-6 der humanen Pankreasadenokarzinomzelllinie A818 bildet unter 3D-Kulturbedingungen (d.h. keine Substratadhärenz) einschichtige epitheliale Hohlkugeln („hollow spheres“) aus. In dieser Struktur vorliegende Zellen weisen wieder Eigenschaften normaler epithelialer Pankreasgangzellen auf (Lehnert et al., 2001), was das System besonders interessant für Untersuchungen hinsichtlich der dafür entscheidenden Differenzierungsvorgänge macht. Die biologische Funktion des morphoregulatorischen und lumenbildenden Faktors Epimorphin wurde im Rahmen dieser Arbeit an dem A818-6-Differenzierungsmodell untersucht. Weiterhin wurden Untersuchungen durchgeführt, die allgemeine Hinweise zum Mechanismus der Lumenentstehung während der A818-6 „hollow sphere“-Entwicklung lieferten.

Die codierenden DNA-Sequenzen der drei Epimorphin-Isoformen wurden in einen A818-Subklon (A818-4), der kein Lumen unter 3D-Kulturbedingungen ausbildet, und in den lumenbildenden A818-6-Subklon retroviral transfiziert. Die Überexpression der Epimorphin-Isoformen konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Epimorphin-überexprimierenden A818-4-Zellen zeigten morphologisch keine Unterschiede sowohl unter Standard- als auch unter 3D-Kulturbedingungen. Daraus ist zu schließen, dass Epimorphin entweder keinen induktiven Einfluss auf die Lumenbildung ausübt oder den A818-4-Zellen entsprechende Rezeptoren, stromabwärts gelegene Mediatoren oder Komplexpartner, die zur Entfaltung der morphoregulatorischen Funktion des Epimorphins benötigt werden, fehlen. Es konnten weiterhin keine morphologischen Veränderungen in den Epimorphin-überexprimierenden A818-6-Zellen erfasst werden.

Die Zellzyklus-Analysen offenbarten, dass Epimorphin das Proliferationsverhalten der Zellen nicht wesentlich beeinflusst. In A818-4-Zellen konnte tendenziell eine schwache Abnahme der Zellproliferation beobachtet werden. Weiterhin zeigten sich geringe Änderungen im Proteinspiegel von proliferationsassoziierten Molekülen ($p27^{KIP}$, $p21^{WAF1/CIP1}$, Cyclin B und c-Myc).

Die relative Telomeraseaktivität, als ein wichtiges Differenzierungsmerkmal, nahm infolge der Epimorphin-Überexpression in beiden Zelllinien (A818-4 und A818-6) um ca. 15 bis 35 % ab.

Hinsichtlich der Apoptosesensitivität konnte bereits ohne Induktion eine höhere Apoptoserate in Epimorphin-Isoform I und III transduzierten A818-6-Zellen nachgewiesen werden. Wurden die Zellen für mit dem Apoptoseinduktor Anti-CD95 in FCS-freiem Medium inkubiert, erzielte man in den Epimorphin-Isoform I-überexprimierenden A818-6-Zellen eine um ca. 80 % höhere und in Epimorphin-Isoform II-überexprimierenden A818-6-Zellen eine um ca. 57 % geringere Apoptoserate als in der Leervektorkontrolle. Diese Daten korrelierten im Wesentlichen mit dem Expressionsmuster von Apoptose-relevanten Proteinen, wie Bcl-xL und Bcl-2. Da die Apoptoserate auch mittels M30-Färbung, einem Caspase-Spaltprodukt, bestimmt wurde, kann hier von einer Caspase-abhängigen Apoptose ausgegangen werden. Der Apoptose-beeinflussende Signalweg könnte möglicherweise auf

Ebene der Sphingomyelin-Metaboliten zu suchen sein, da konform zur Apoptosesensitivität eine Abnahme der aktiven Sauren Ceramidase evident war. Bisherigem Wissen zufolge können Saure Ceramidase das Verhalten der Zellen im Hinblick auf Apoptose maßgeblich beeinflussen (Herget et al., 2000).

Die Überexpression der Epimorphin Isoform I und III führte in A818-4 und A818-6 zu einer Erhöhung des Protein-Gehalts der Tyrosin-Kinase pp60c-src, die u.a. Prozesse der Exocytose bzw. auch der Sekretion beeinflussen kann. Da auf transkriptioneller Ebene keine Veränderungen vorlagen, bewirkt Epimorphin vermutlich eher eine Stabilisierung des Proteins pp60c-src. Des weiteren konnte immunzytochemisch eine Kolo-kalisation von Epimorphin und pp60c-src festgestellt werden, die vorwiegend zytoplasmatisch in vesikulären Strukturen vorlag. Die putativ membranverankerten Epimorphin-Isoformen I und II konnten zudem mit dem pp60c-src-Protein ko-immunpräzipitiert werden. Damit wurde erstmals ein Interaktionspartner des Epimorphins nachgewiesen.

Die Studien zur Fragestellung, welche Signalwege für die Entwicklung der A818-6 „hollow spheres“ von Bedeutung sind, ergaben, dass durch Inhibierung der pp60c-src Aktivität mittels Herbimycin A eine konzentrationsabhängige Verschlechterung der Lumenbildung erzielt wird. Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass ebenfalls auf Ebene der Sekretion die Funktion des Epimorphin in der „hollow sphere“-Entwicklung zu suchen ist.

Während der „hollow sphere“-Entwicklung konnten zwar apoptotische Zellen im Zentrum der Zellaggregate nachgewiesen werden, jedoch konnte durch Inhibierung der Apoptose die Lumenbildung nicht blockiert oder reduziert werden. Damit unterscheidet sich dieses System von dem MCF-7-System, welches nach Rekonstitution von CEACAM1-4 S ein durch Apoptose hervorgehendes Lumen entwickelt (Kirshner et al., 2003). Im Gegensatz zum A818-6-System zeigt jedoch die apikale Seite im MCF-7-System zum Lumen, was möglicherweise die unterschiedlichen Mechanismen bei der Lumentstehung erklärt.

Die zuvor entdeckte Wirkung von Epimorphin auf die Saure Ceramidase führte zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Rolle der Sphingomyelin-Metaboliten in der „hollow sphere“-Entwicklung. Diese ergaben eine kontinuierliche Erhöhung der sauren Ceramidase im zeitlichen Verlauf der „hollow sphere“-Bildung. Durch Inhibierung der sauren Ceramidase als auch der sauren Sphingomyelinase konnte die Lumenbildung blockiert werden. Immunzytochemische Experimente zur Beurteilung der Zellpolarität innerhalb dieser durch Inhibitorbehandlung kompakten A818-6-Zellaggregate offenbarten dennoch eine „hollow sphere“-typische Polarität.

Ebenfalls konnte durch gezielte pharmakologische Inhibition der Proteinkinase C PKC μ (PKD) die Lumenbildung während der „hollow sphere“-Entwicklung unterbunden werden. Im Gegensatz zu den Zellaggregaten, deren saure Sphingomyelinase inhibiert wurden, wiesen diese Gö6983-behandelten Zellaggregate keine Polarität mehr auf. Dies stützt Befunde zur Rolle von PKD bei der Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität bzw. bei der Regulation des Vesikeltransports vom trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Epimorphin gemeinsam mit pp60c-src beim Vesikeltransport eine entscheidende Rolle spielt und damit die Grundlage zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität liefert.

Summary

The subclone A818-6 of the ductal pancreatic carcinoma cell line A818 develops epithelial hollow spheres, defined by a monolayer surrounding a lumen. Compared to the monolayer cells, the hollow sphere cells recover benign cellular attributes in many respects, suggesting this system to investigate the critical epithelial differentiation steps. This thesis characterizes the biologic functions of the morphogenetic factor epimorphin in the A818-6-differentiation-model. Investigations that provide common evidence of the mechanisms of lumen formation during the development of A818-6 hollow spheres are also presented.

For the characterization of their function the coding DNA-sequences of the epimorphin isoforms were retrovirally transfected into the subclone A818-4, that lacks lumen formation under 3D culture conditions and into the subclone A818-6 that is capable of lumen formation. The overexpression of the epimorphin isoforms could be confirmed on the protein level. A818-4 cells showed no morphologic differences, neither under 3D culturing conditions nor under standard conditions. Hence we conclude that epimorphin has no inductive influence on lumen formation or that A818-4 cells lack receptors, mediators or complex partners, which are essential for the evolvement of the morphoregulatory function of epimorphin.

There was no change in hollow sphere development by the overexpression of epimorphin in A818-6 cells to be observed.

Cell cycle analysis revealed that epimorphin does not influence cell proliferation remarkably. However, some minor differences in the expression of proliferation-associated antigens could be detected (p27^{KIP}, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin B und c-myc).

The relative telomerase activity, as an important marker for differentiation, was reduced after the overexpression of epimorphin in either cell lines (A818-4 and A818-6) by 15 - 35%.

Regarding the apoptosis sensitivity a higher apoptosis rate in epimorphin I-and III-transduced A818-6 cells without induction was noted. The apoptosis sensitivity in epimorphin isoform I-transduced A818-6 cells was approx. 80 % higher compared to control cells after stimulation with anti-CD95 (CH11) under starving conditions. While epimorphin isoform II-overexpressing A818-6 cells showed approx. 57 % decreased apoptosis rate in this setting. These data correlated with the expression pattern of apoptosis-relevant proteins, such as Bcl-xL and Bcl-2. Since the apoptosis rate was also determined by M30-staining detecting, a cleavage product of caspase 3, the apoptosis seems caspase-dependent. The signaling pathway influencing the process of apoptosis could be identified among the sphingolipid metabolites, because the amount of active acidic ceramidases correlated with apoptosis sensitivity. Acidic ceramidases are influencing apoptotic activities (Herget et al., 2000)..

A striking influence of the overexpression of epimorphin isoform I and III in A818-4 and A818-6 cells was detected on the protein level of pp60c-src which is described to be involved in exocytosis.

Because there was no influence on the transcriptional level detectable, epimorphin is believed to stabilize pp60-src proteins. Furthermore a colocalisation of epimorphin and pp60-src could be detected by immunostaining that was mainly located in vesicular structures in the cytoplasm. In addition the putative membrane bound epimorphin isoforms I and II could be co-immunoprecipitated with the pp60-src protein. Thus for the first time an interaction partner of epimorphin was revealed.

The studies concerning the issue of signaling pathways determining the development of A818-6 hollow spheres resulted in the observation that the lumen formation was impaired by the inhibition of pp60-src activity by herbimycin A. This finding suggests that the function of epimorphin in hollow sphere development can be traced to processes of exocytosis.

Even though apoptotic cells could be detected in the center of the aggregates during hollow sphere development, the inhibition of apoptosis did not reduce the ability of lumen formation.

Thereby this system differs from the MCF-7 system, which develops a lumen by apoptosis after reconstitution of CEACAM 1-4 S (Kirshner, 2003 149 /id). In contrast to the A818-6 system the apical side of the MCF-7-system is directed to the lumen, possibly explaining these differences.

The investigations of the role of sphingomyelin metabolites in the hollow sphere development yielded a continuous increase of acid ceramidases during hollow sphere formation. This lumen formation was blocked by the inhibition of the acid ceramidases as well as the acid sphingomyelinases. Immunocytochemical experiments were performed to determine cell polarity within the inhibitor-treated A818-6 aggregates and revealed a hollow sphere typical polarity.

Lumen formation during hollow sphere development could also be inhibited by the pharmacological blockade of the protein kinase C PKC μ (PKD). In contrast to aggregates inhibited by acid sphingomyelinase inhibitor the PKD inhibited aggregates exhibited no polarity anymore. These observations corroborated the theory of a role of PKD in maintenance of the apical basal membrane and regulation of vesicle transport/fission respectively.

Taken together, these results indicate a role of epimorphin in vesicle transport in cooperation with pp60c-src, thereby providing a basis for development and maintenance of cell polarity.

Abkürzungsverzeichnis

AcCer	„Acid Ceramidase“
AEBSF	„4-(2-Aminoethyl)benzenesulphonyl fluoride“
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest. oder dH ₂ O	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA2	“Breast Cancer 2 Gene”
BSA	„Bovine Serum Albumin“
bZIP	Proteinfamilie: „basic Leucine Zipper Protein“
Cdk's	“Cyclin-dependend Kinases”
cDNA	“Complementary Desoxyribonucleic Acid”
C/EBP	„CAAT Enhancer Binding Protein“
Erk	“Extracellular Signal Regulated Kinase”
Cea	„Carcinoembryonic Antigen“
CEACAM	„Carcinoembryonic Antigen related Cell Adhesion Molecule“
CHAPS	„3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate“
CMV	Cytomegalovirus
CoA	Coenzym A
c-src	zelluläres Homolog des “Rous sarcoma virus » Onkogens
DAPI	4-, 6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatografie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic Acid“
dNTP	2.-Desoxy-Nukleosid-5.-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	“Epidermal Growth Factor”
EGFP	“Enhanced Green Fluorescent Protein”
EGTA	“Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic”
Epi	Epimorphin
EpiI	Epimorphin-Isoform 1

EpiII	Epimorphin-Isoform 2
EpiIII	Epimorphin-Isoform 3
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FCS	“Fetal Calf Serum”
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G418	“Aminoglycoside antibiotic geneticin”
gag	Retrovirale Gene, die für verschiedene Struktur- bzw. Hüll-Proteine codieren
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	“Hank’s Balanced Salt Solution”
HA	Hämagglutinin
HGF	“Hepatocyte Growth Factor”
HRP	“Horeseradish Peroxidase”
HS	“Hollow Sphere”
hTERT	“Human Telomerase Reverse Transcriptase”
IGF	“Insulin-like Growth Factor”
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ITAS	“Internal Amplification Standard”
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LAP	Isoform von C/EBP-beta (“Liver Activator Protein”)
LIP	Isoform von C/EBP-beta („Liver-enriched Inhibitory Protein“)
Lsg.	Lösung
M30	ein durch Caspase erzeugtes Cytokeratin-18 Spaltprodukt
MAP-Kinase	„Mitogen-activated Protein-Kinase“
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
3-MA	3-Methyladenin
MetOH	Methanol
ML	„Monolayer“
MLV	„Murine Leukemia Virus“
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	„messenger“ RNA

Abkürzungsverzeichnis

Muc-1	Mucin-1
NegKo	Negativkontrolle
NOE	N-Oleylethanolamin
NP-40	Nonylphenyl-Polyethylen Glycol
NSF	„N-ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein“
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PDAC	“Pancreatic Ductal Adenocarcinoma”
PJ	Propidiumjodid
PKC	Proteinkinase C
pol	Retrovirale Gene, die für verschiedene Enzyme codieren (z. B.: Reverse Transkriptase, RNase H)
PosKo	Positivkontrolle
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	“Ribonucleic Acid”
RNase	Ribonuklease
rpm	“rounds per minute”
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SekAk-Ko	Sekundär-Antikörper-Kontrolle
SNARE	“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Fusion Attachment Protein Receptor”
SNAP	“Soluble NSF Attachment Protein”
SPH oder Sph	Sphäroid
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TEMED	“N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine”
TGF	“Transforming Growth Factor”
TNF	“Tumor Necrosis Factor”
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAP	“Telomeric Repeat Amplification Protocol”

u. a.	unter anderem
TW	Transwell
UV	Ultraviolett
VEGF	“Vascular Endothelial Growth Factor”
vs.	“versus“
VSV-G	„Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein“
Y	Tyrosin
zFA-fmk	“Z-Phe-Ala-diazomethylketone”
zVAD-fmk	“Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketone”
ZZ	Zellzyklus

Referenzen

- Adamson, E.D. 1993. Growth factors and their receptors in development. *Dev. Genet.* 14:159-164.
- Aguirre-Ghiso, J.A., Y. Estrada, D. Liu und L. Ossowski. 2003. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res.* 63:1684-1695.
- Aguirre-Ghiso, J.A., D. Liu, A. Mignatti, K. Kovalski und L. Ossowski. 2001. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol. Biol. Cell* 12:863-879.
- Ahlgren, J.D. 1996. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin. Oncol.* 23:241-250.
- Akiyama, M., M. Amagai, L.T. Smith, K. Hashimoto, H. Shimizu und T. Nishikawa. 1999. Epimorphin expression during human foetal hair follicle development. *Br. J. Dermatol.* 141:447-452.
- Anderson, D.N., S. Campbell und K.G. Park. 1996. Accuracy of laparoscopic ultrasonography in the staging of upper gastrointestinal malignancy. *Br. J. Surg.* 83:1424-1428.
- Anderson, M.A. und J.M. Scheiman. 2002. Nonmucinous cystic pancreatic neoplasms. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 12:769-79, viii.
- Bang, B., O. Baadsgaard, L. Skov und M. Jaattela. 2004. Inhibitors of cysteine cathepsin and calpain do not prevent ultraviolet-B-induced apoptosis in human keratinocytes and HeLa cells. *Arch. Dermatol. Res.* 296:67-73.
- Bar-Sagi, D. 2001. A Ras by any other name. *Mol. Cell Biol.* 21:1441-1443.
- Barak, A., L.S. Morse und T. Goldkorn. 2001. Ceramide: a potential mediator of apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:247-254.
- Bardeesy, N. und R.A. DePinho. 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* 2:897-909.
- Barman, K.K., G. Premalatha und V. Mohan. 2003. Tropical chronic pancreatitis. *Postgrad. Med. J.* 79:606-615.
- Barnekow, A. und M. Gessler. 1986. Activation of the pp60c-src kinase during differentiation of monomyelocytic cells in vitro. *EMBO J.* 5:701-705.
- Barnekow, A., R. Jahn und M. Schartl. 1990. Synaptophysin: a substrate for the protein tyrosine kinase pp60c-src in intact synaptic vesicles. *Oncogene* 5:1019-1024.
- Baron, C.L. und V. Malhotra. 2002. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 295:325-328.
- Bennett, M.K., J.E. Garcia-Arraras, L.A. Elferink, K. Peterson, A.M. Fleming, C.D. Hazuka und R.H. Scheller. 1993. The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74:863-873.
- Berger, N.A. 1985. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.* 101:4-15.

-
- Berthiaume, F., P.V. Moghe, M. Toner und M.L. Yarmush. 1996. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J.* 10:1471-1484.
- Black, E.J., W. Clark und D.A. Gillespie. 2000. Transient deactivation of ERK signalling is sufficient for stable entry into G0 in primary avian fibroblasts. *Curr. Biol.* 10:1119-1122.
- Blobe, G.C., W.P. Schieman und H.F. Lodish. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342:1350-1358.
- Blommaert, E.F., U. Krause, J.P. Schellens, H. Vreeling-Sindelarova und A.J. Meijer. 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243:240-246.
- Bonni, A., A. Brunet, A.E. West, S.R. Datta, M.A. Takasu und M.E. Greenberg. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- Bourbon, N.A., J. Yun, D. Berkey, Y. Wang und M. Kester. 2001. Inhibitory actions of ceramide upon PKC-epsilon/ERK interactions. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280:C1403-C1411.
- Brown, D.A. und E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275:17221-17224.
- Brugge, J.S., P.C. Cotton, A.E. Queral, J.N. Barrett, D. Nonner und R.W. Keane. 1985. Neurones express high levels of a structurally modified, activated form of pp60c-src. *Nature* 316:554-557.
- Brummer, J., M. Neumaier, C. Gopfert und C. Wagener. 1995. Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11:1649-1655.
- Butt, K.I., M. Manabe, H. Yaguchi, R. Tsuboi und H. Ogawa. 1996. Immunolocalization of epimorphin in skin. *J. Dermatol. Sci.* 13:193-201.
- Buxton, R.S. und A.I. Magee. 1992. Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin. Cell Biol.* 3:157-167.
- Campbell, S.L., R. Khosravi-Far, K.L. Rossman, G.J. Clark und C.J. Der. 1998. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17:1395-1413.
- Cardenas, M., Y.V. Fabila, S. Yum, J. Cerbon, F.D. Bohmer, R. Wetzker, T. Fujisawa, T.C. Bosch und L.M. Salgado. 2000. Selective protein kinase inhibitors block head-specific differentiation in hydra. *Cell Signal.* 12:649-658.
- Carpelan-Holmstrom, M., S. Nordling, E. Pukkala, R. Sankila, J. Luttges, G. Kloppel und C. Haglund. 2005. Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut* 54:385-387.
- Cartwright, C.A., R. Simantov, P.L. Kaplan, T. Hunter und W. Eckhart. 1987. Alterations in pp60c-src accompany differentiation of neurons from rat embryo striatum. *Mol. Cell Biol.* 7:1830-1840.
- Cau, J. und A. Hall. 2005. Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* 118:2579-2587.
- Chalmers, A.D., M. Pambos, J. Mason, S. Lang, C. Wylie und N. Papalopulu. 2005. aPKC, Crumbs3 and Lgl2 control apicobasal polarity in early vertebrate development. *Development* 132:977-986.

Chen, G., M. Hitomi, J. Han und D.W. Stacey. 2000. The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J. Biol. Chem.* 275:38973-38980.

Chen, T., W. Zimmermann, J. Parker, I. Chen, A. Maeda und S. Bolland. 2001. Biliary glycoprotein (BGP, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J. Leukoc. Biol.* 70:335-340.

Chen, W.B., W. Lenschow, K. Tiede, J.W. Fischer, H. Kalthoff und H. Ungefroren. 2002. Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J. Biol. Chem.* 277:36118-36128.

Cremesti, A.E., F.M. Goni und R. Kolesnick. 2002. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome?. *FEBS Lett.* 531:47-53.

Daido, S., T. Kanzawa, A. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kondo und S. Kondo. 2004. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.* 64:4286-4293.

Darios, F., O. Corti, C.B. Lucking, C. Hampe, M.P. Muriel, N. Abbas, W.J. Gu, E.C. Hirsch, T. Rooney, M. Ruberg und A. Brice. 2003. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum. Mol. Genet.* 12:517-526.

Debnath, J., K.R. Mills, N.L. Collins, M.J. Reginato, S.K. Muthuswamy und J.S. Brugge. 2002. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 111:29-40.

Degli, E.M., G. Ferry, P. Masdehors, J.A. Boutin, J.A. Hickman und C. Dive. 2003. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J. Biol. Chem.* 278:15749-15757.

Deppert, W. 1996. Binding of MAR-DNA elements by mutant p53: possible implications for its oncogenic functions. *J. Cell Biochem.* 62:172-180.

Dietrich, C., N. Gumpert, I. Heit, M. Borchert-Stuhltrager, F. Oesch und R. Wieser. 2001. Rottlerin induces a transformed phenotype in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:575-579.

Djojoseburoto, M.W., Y.S. Choi, H.W. Lee und K.L. Rudolph. 2003. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol. Cells* 15:164-175.

Downward, J. 1998. Ras signalling and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:49-54.

Eklom, P., M. Eklom, L. Fecker, G. Klein, H.Y. Zhang, Y. Kadoya, M.L. Chu, U. Mayer und R. Timpl. 1994. Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development* 120:2003-2014.

Ely, C.M., W.M. Tomiak, C.M. Allen, L. Thomas, G. Thomas und S.J. Parsons. 1994. pp60c-src enhances the acetylcholine receptor-dependent catecholamine release in vaccinia virus-infected bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 62:923-933.

Ergun, S., N. Kilik, G. Ziegeler, A. Hansen, P. Nollau, J. Gotze, J.H. Wurnbach, A. Horst, J. Weil, M. Fernando und C. Wagener. 2000. CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol. Cell* 5:311-320.

Fiedler, A., C. Knorre, Y. Franke, D. Henne-Bruns, B. Kremer, J. Luttges, M. Maier, M. Gerster, K. Bleicher, E. Bayer und H. Kalthoff. 1998. Growth inhibition of pancreatic tumor cells by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Langenbecks Arch. Surg.* 383:269-275.

-
- Formigli, L., F. Francini, E. Meacci, M. Vassalli, D. Nosi, F. Quercioli, B. Tiribilli, C. Bencini, C. Piperio, P. Bruni und S.Z. Orlandini. 2002. Sphingosine 1-phosphate induces Ca^{2+} transients and cytoskeletal rearrangement in C2C12 myoblastic cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 282:C1361-C1373.
- Formigli, L., E. Meacci, C. Sassoli, F. Chellini, R. Giannini, F. Quercioli, B. Tiribilli, R. Squecco, P. Bruni, F. Francini und S. Zecchi-Orlandini. 2005. Sphingosine 1-phosphate induces cytoskeletal reorganization in C2C12 myoblasts: physiological relevance for stress fibres in the modulation of ion current through stretch-activated channels. *J. Cell Sci.* 118:1161-1171.
- Forslind, B. 1994. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm. Venereol.* 74:1-6.
- Fournes, B., S. Sadekova, C. Turbide, S. Letourneau und N. Beauchemin. 2001. The CEACAM1-L Ser503 residue is crucial for inhibition of colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene* 20:219-230.
- Fritsch, C., E.A. Swietlicki, O. Lefebvre, M. Keding, H. Iordanov, M.S. Levin und D.C. Rubin. 2002. Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J. Clin. Invest* 110:1629-1641.
- Futerman, A.H. und Y.A. Hannun. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 5:777-782.
- Gebhardt, C., W. Meyer, M. Reichel und P.H. Wunsch. 2000. Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Arch. Surg.* 385:14-20.
- Geng, Z., D. Zhang und Y. Liu. 2003. Expression of telomerase hTERT in human non-small cell lung cancer and its correlation with c-myc gene. *Chin Med. J. (Engl.)* 116:1467-1470.
- Ghadirian, P., P. Boyle, A. Simard, J. Baillargeon, P. Maisonneuve und C. Perret. 1991. Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int. J. Pancreatol.* 10:183-196.
- Ghanekar, Y. und M. Lowe. 2005. Protein kinase D: activation for Golgi carrier formation. *Trends Cell Biol.* 15:511-514.
- Gittes, G.K., P.E. Galante, D. Hanahan, W.J. Rutter und H.T. Debase. 1996. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 122:439-447.
- Goyal, A., R. Singh, E.A. Swietlicki, M.S. Levin und D.C. Rubin. 1998. Characterization of rat epimorphin/syntaxin 2 expression suggests a role in crypt-villus morphogenesis. *Am. J. Physiol* 275:G114-G124.
- Gross, A., X.M. Yin, K. Wang, M.C. Wei, J. Jockel, C. Millman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst und S.J. Korsmeyer. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274:1156-1163.
- Grulich, C., M.C. Sullards, Z. Fuks, A.H. Merrill, Jr. und R. Kolesnick. 2000. CD95(Fas/APO-1) signals ceramide generation independent of the effector stage of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275:8650-8656.
- Gulbins, E. 2003. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol. Res.* 47:393-399.
- Guweidhi, A., J. Kleeff, H. Adwan, N.A. Giese, M.N. Wente, T. Giese, M.W. Buchler, M.R. Berger und H. Friess. 2005. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann. Surg.* 242:224-234.

Hahn, S.A. und D.K. Bartsch. 2004. Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 33:919-34, ix.

Hahn, S.A., M. Schutte, A.T. Hoque, C.A. Moskaluk, L.T. da Costa, E. Rozenblum, C.L. Weinstein, A. Fischer, C.J. Yeo, R.H. Hruban und S.E. Kern. 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271:350-353.

Harmon, B., L. Bell und L. Williams. 1984. An ultrastructural study on the "meconium corpuscles" in rat foetal intestinal epithelium with particular reference to apoptosis. *Anat. Embryol. (Berl)* 169:119-124.

Heinrich, M., J. Neumeyer, M. Jakob, C. Hallas, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, M. Wickel, W. Schneider-Brachert, A. Trauzold, A. Hethke und S. Schutze. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death. Differ.* 11:550-563.

Heinrichs, S. und W. Deppert. 2003. Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals. *Oncogene* 22:555-571.

Henrique, D. und F. Schweisguth. 2003. Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13:341-350.

Hirai, Y. 1993. Molecular cloning of human epimorphin: identification of isoforms and their unique properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:1332-1337.

Hirai, Y. 1994. Sodium-dodecyl-sulfate-resistant complex formation of epimorphin monomers and interaction of the 150-kDa complex with the cell surface. *Eur. J. Biochem.* 225:1133-1139.

Hirai, Y., A. Lochter, S. Galosy, S. Koshida, S. Niwa und M.J. Bissell. 1998. Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 140:159-169.

Hirai, Y., D. Radisky, R. Boudreau, M. Simian, M.E. Stevens, Y. Oka, K. Takebe, S. Niwa und M.J. Bissell. 2001. Epimorphin mediates mammary luminal morphogenesis through control of C/EBPbeta. *J. Cell Biol.* 153:785-794.

Hirai, Y., K. Takebe, M. Takashina, S. Kobayashi und M. Takeichi. 1992. Epimorphin: a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. *Cell* 69:471-481.

Hirose, M., S. Watanabe, H. Oide, T. Kitamura, A. Miyazaki und N. Sato. 1996. A new function of Ito cells in liver morphogenesis: evidence using a novel morphogenic protein, epimorphin, in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:155-160.

Hockenbery, D., G. Nunez, C. Millman, R.D. Schreiber und S.J. Korsmeyer. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336.

Horikoshi, S., M. Yoshikawa, T. Shibata, K. Takahashi, I. Shirato und Y. Tomino. 2001. Protein localization and mRNA expression of epimorphin in mouse and human kidneys. *Exp. Nephrol.* 9:412-419.

Horvath, A.R., L. Muszbek und S. Kellie. 1992. Translocation of pp60c-src to the cytoskeleton during platelet aggregation. *EMBO J.* 11:855-861.

Howe, G.R., M. Jain, J.D. Burch und A.B. Miller. 1991. Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. *Int. J. Cancer* 47:323-328.

Hruban, R.H., M. Goggins, J. Parsons und S.E. Kern. 2000a. Progression model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 6:2969-2972.

-
- Hruban, R.H., A.D. van Mansfeld, G.J. Offerhaus, D.H. van Weering, D.C. Allison, S.N. Goodman, T.W. Kensler, K.K. Bose, J.L. Cameron und J.L. Bos. 1993. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am. J. Pathol.* 143:545-554.
- Hruban, R.H., R.E. Wilentz und S.E. Kern. 2000b. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J. Pathol.* 156:1821-1825.
- Hsieh, J.T., W. Luo, W. Song, Y. Wang, D.I. Kleinerman, N.T. Van und S.H. Lin. 1995. Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res.* 55:190-197.
- Hu, Y., M.A. Benedict, L. Ding und G. Nunez. 1999. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18:3586-3595.
- Huang, J., J.D. Hardy, Y. Sun und J.E. Shively. 1999. Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 23):4193-4205.
- Huang, L., T.L. Goodrow, S.Y. Zhang, A.J. Klein-Szanto, H. Chang und B.A. Ruggeri. 1996. Deletion and mutation analyses of the P16/MTS-1 tumor suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 56:1137-1141.
- Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto und S. Nagata. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243.
- Jansen, M., N. Fukushima, C. Rosty, K. Walter, R. Altink, T.V. Heek, R. Hruban, J.G. Offerhaus und M. Goggins. 2002. Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol. Ther.* 1:293-296.
- Janz, R. und T.C. Sudhof. 1998. Cellugyrin, a novel ubiquitous form of synaptogyrin that is phosphorylated by pp60c-src. *J. Biol. Chem.* 273:2851-2857.
- Joo, Y.E., J.S. Rew, S.K. Choi, H.S. Bom, C.S. Park und S.J. Kim. 2002. Expression of e-cadherin and catenins in early gastric cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* 35:35-42.
- Kallassy, M., N. Martel, O. Damour, H. Yamasaki und H. Nakazawa. 1998. Growth arrest of immortalized human keratinocytes and suppression of telomerase activity by p21WAF1 gene expression. *Mol. Carcinog.* 21:26-36.
- Kermorgant, S., D. Zicha und P.J. Parker. 2004. PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J.* 23:3721-3734.
- Khosravi-Far, R., S. Campbell, K.L. Rossman und C.J. Der. 1998. Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv. Cancer Res.* 72:57-107.
- Kim, D.S., S.Y. Kim, J.H. Chung, K.H. Kim, H.C. Eun und K.C. Park. 2002. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal.* 14:779-785.
- Kim, E. und W. Deppert. 2004. Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *J. Cell Biochem.* 93:878-886.
- Kirchhausen, T. 2000a. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* 69:699-727.

- Kirchhausen, T. 2000b. Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:187-198.
- Kirshner, J., C.J. Chen, P. Liu, J. Huang und J.E. Shively. 2003. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:521-526.
- Kitanaka, A., M. Waki, H. Kamano, T. Tanaka, Y. Kubota, H. Ohnishi, J. Takahara und S. Irino. 1994. Antisense src expression inhibits proliferation and erythropoietin-induced erythroid differentiation of K562 human leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:1534-1540.
- Klapper, W., K. Heidorn, K. Kuhne, R. Parwaresch und G. Krupp. 1998. Telomerase activity in 'immortal' fish. *FEBS Lett.* 434:409-412.
- Klein, W.M., R.H. Hruban, A.J. Klein-Szanto und R.E. Wilentz. 2002. Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod. Pathol.* 15:441-447.
- Kondo, T., T. Matsuda, T. Kitano, A. Takahashi, M. Tashima, H. Ishikura, H. Umehara, N. Domae, T. Uchiyama und T. Okazaki. 2000. Role of c-jun expression increased by heat shock- and ceramide-activated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. Possible involvement of ceramide in heat shock-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275:7668-7676.
- Konig, J., M. Hartel, A.T. Nies, M.E. Martignoni, J. Guo, M.W. Buchler, H. Friess und D. Keppler. 2005. Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer* 115:359-367.
- Koshida, S. und Y. Hirai. 1997. Identification of cellular recognition sequence of epimorphin and critical role of cell/epimorphin interaction in lung branching morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234:522-525.
- Kraveka, J.M., L. Li, J. Bielawski, L.M. Obeid und B. Ogretmen. 2003. Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all-trans-retinoic acid in human neuroblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 419:110-119.
- Krupp, G., K. Kuhne, S. Tamm, W. Klapper, K. Heidorn, A. Rott und R. Parwaresch. 1997. Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay. *Nucleic Acids Res.* 25:919-921.
- Kunath, T., C. Ordonez-Garcia, C. Turbide und N. Beauchemin. 1995. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 11:2375-2382.
- Kurinna, S.M., C.C. Tsao, A.F. Nica, T. Jiffar und P.P. Ruvolo. 2004. Ceramide promotes apoptosis in lung cancer-derived A549 cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res.* 64:7852-7856.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lal, G., G. Liu, B. Schmocker, P. Kaurah, H. Ozcelik, S.A. Narod, M. Redston und S. Gallinger. 2000. Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germ-line p16, BRCA1, and BRCA2 mutations. *Cancer Res.* 60:409-416.
- Leevers, S.J. und C.J. Marshall. 1992. MAP kinase regulation--the oncogene connection. *Trends Cell Biol.* 2:283-286.

-
- Lehnert, L., M.M. Lerch, Y. Hirai, M.L. Kruse, W. Schmiegel und H. Kalthoff. 2001b. Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J. Cell Biol.* 152:911-922.
- Lehnert, L., M.M. Lerch, Y. Hirai, M.L. Kruse, W. Schmiegel und H. Kalthoff. 2001c. Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J. Cell Biol.* 152:911-922.
- Lehnert, L., M.M. Lerch, Y. Hirai, M.L. Kruse, W. Schmiegel und H. Kalthoff. 2001a. Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J. Cell Biol.* 152:911-922.
- Lehnert, L., M.M. Lerch, Y. Hirai, M.L. Kruse, W. Schmiegel und H. Kalthoff. 2001d. Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J. Cell Biol.* 152:911-922.
- Leist, M. und M. Jaattela. 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death. Differ.* 8:324-326.
- Leonova, E.V. und Y. Raphael. 1997. Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxically damaged organ of Corti. *Hear. Res.* 113:14-28.
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu und J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri und X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Liljedahl, M., Y. Maeda, A. Colanzi, I. Ayala, J. Van Lint und V. Malhotra. 2001. Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104:409-420.
- Lim, Y.J., J.K. Lee, W.Y. Jang, S.Y. Song, K.T. Lee, S.W. Paik und J.C. Rhee. 2004. Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Korean J. Intern. Med.* 19:15-18.
- Lin, C.F., C.L. Chen, W.T. Chang, M.S. Jan, L.J. Hsu, R.H. Wu, M.J. Tang, W.C. Chang und Y.S. Lin. 2004. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279:40755-40761.
- Lin, H.H., T.P. Yang, S.T. Jiang, H.Y. Yang und M.J. Tang. 1999. Bcl-2 overexpression prevents apoptosis-induced Madin-Darby canine kidney simple epithelial cyst formation. *Kidney Int.* 55:168-178.
- Lincz, L.F., A. Buret und G.F. Burns. 1997. Formation of spheroid structures in a human colon carcinoma cell line involves a complex series of intercellular rearrangements. *Differentiation* 61:261-274.
- Linstedt, A.D., M.L. Vetter, J.M. Bishop und R.B. Kelly. 1992a. Specific association of the proto-oncogene product pp60c-src with an intracellular organelle, the PC12 synaptic vesicle. *J. Cell Biol.* 117:1077-1084.
- Linstedt, A.D., M.L. Vetter, J.M. Bishop und R.B. Kelly. 1992b. Specific association of the proto-oncogene product pp60c-src with an intracellular organelle, the PC12 synaptic vesicle. *J. Cell Biol.* 117:1077-1084.

- Linz-McGillem, L.A., J. Moitra und J.G. Garcia. 2004. Cytoskeletal rearrangement and caspase activation in sphingosine 1-phosphate-induced lung capillary tube formation. *Stem Cells Dev.* 13:496-508.
- Lionetto, R., V. Pugliese, P. Bruzzi und R. Rosso. 1995. No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer* 31A:882-887.
- Liu, J.P. 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104.
- Liu, Q., Y.X. Yan, M. McClure, H. Nakagawa, F. Fujimura und A.K. Rustgi. 1995. MTS-1 (CDKN2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene* 10:619-622.
- Lohr, M., G. Kloppel, P. Maisonneuve, A.B. Lowenfels und J. Luttges. 2005. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 7:17-23.
- Lowenfels, A.B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R.W. Ammann, P.G. Lankisch, J.R. Andersen, E.P. Dimagno, A. Andren-Sandberg und L. Domellof. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 328:1433-1437.
- Lumadue, J.A., C.A. Griffin, M. Osman und R.H. Hruban. 1995. Familial pancreatic cancer and the genetics of pancreatic cancer. *Surg. Clin. North Am.* 75:845-855.
- Luttges, J., H. Galehdari, V. Brocker, I. Schwarte-Waldhoff, D. Henne-Bruns, G. Kloppel, W. Schmiegel und S.A. Hahn. 2001. Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 158:1677-1683.
- Luttges, J., I. Vogel, M. Menke, D. Henne-Bruns, B. Kremer und G. Kloppel. 1998. Clear cell carcinoma of the pancreas: an adenocarcinoma with ductal phenotype. *Histopathology* 32:444-448.
- Macara, I.G. 2004. Par proteins: partners in polarization. *Curr. Biol.* 14:R160-R162.
- Maeda, Y., G.V. Beznoussenko, J. Van Lint, A.A. Mironov und V. Malhotra. 2001. Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *EMBO J.* 20:5982-5990.
- Maisonneuve, P. und A.B. Lowenfels. 2002. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig. Dis.* 20:32-37.
- Mandal, M. und R. Kumar. 1997. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J. Biol. Chem.* 272:14183-14187.
- Mangray, S. und T.C. King. 1998. Molecular pathobiology of pancreatic adenocarcinoma. *Front Biosci.* 3:D1148-D1160.
- Marinari, U.M., M. Nitti, M.A. Pronzato und C. Domenicotti. 2003. Role of PKC-dependent pathways in HNE-induced cell protein transport and secretion. *Mol. Aspects Med.* 24:205-211.
- Marshall, C. 1999. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:732-736.
- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, S.A. Susin, G. Beutner, D. Brdiczka, R. Remy, Z.H. Xie, J.C. Reed und G. Kroemer. 1998. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187:1261-1271.

-
- Massague, J., S.W. Blain und R.S. Lo. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103:295-309.
- Maxam, A.M. und W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74:560-564.
- Mellstrom, K., C. Bjelfman, U. Hammerling und S. Pahlman. 1987. Expression of c-src in cultured human neuroblastoma and small-cell lung carcinoma cell lines correlates with neurocrine differentiation. *Mol. Cell Biol.* 7:4178-4184.
- Messina, G., C. Blasi, S.A. La Rocca, M. Pompili, A. Calconi und M. Grossi. 2005. p27Kip1 acts downstream of N-cadherin-mediated cell adhesion to promote myogenesis beyond cell cycle regulation. *Mol. Biol. Cell* 16:1469-1480.
- Michaud, D.S. 2004. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 59:99-111.
- Miknyoczki, S.J., H. Chang, A. Klein-Szanto, C.A. Dionne und B.A. Ruggeri. 1999a. The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 5:2205-2212.
- Miknyoczki, S.J., C.A. Dionne, A.J. Klein-Szanto und B.A. Ruggeri. 1999b. The novel Trk receptor tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits antitumor efficacy against human pancreatic carcinoma (Panc1) xenograft growth and in vivo invasiveness. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 880:252-262.
- Mills, K.R., M. Reginato, J. Debnath, B. Queenan und J.S. Brugge. 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:3438-3443.
- Mizumoto, K., N. Suehara, T. Muta, S. Kitajima, N. Hamasaki, Y. Tominaga, H. Shimura und M. Tanaka. 1996. Semi-quantitative analysis of telomerase in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol.* 31:894-897.
- Moore, P.S., S. Beghelli, G. Zamboni und A. Scarpa. 2003. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 2:7.
- Moynahan, M.E., A.J. Pierce und M. Jasin. 2001. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol. Cell* 7:263-272.
- Mullis, K.B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 48:579-582.
- Neumaier, M., S. Paululat, A. Chan, P. Matthes und C. Wagener. 1993. Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:10744-10748.
- Nittka, S., J. Gunther, C. Ebisch, A. Erbersdobler und M. Neumaier. 2004. The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 23:9306-9313.
- Obrink, B. 1997. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:616-626.
- Ogretmen, B., J.M. Kravets, D. Schady, J. Usta, Y.A. Hannun und L.M. Obeid. 2001. Molecular mechanisms of ceramide-mediated telomerase inhibition in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 276:32506-32514.

- Ojajarvi, I.A., T.J. Partanen, A. Ahlbom, P. Boffetta, T. Hakulinen, N. Jourenkova, T.P. Kauppinen, M. Kogevinas, M. Porta, H.U. Vainio, E. Weiderpass und C.H. Wesseling. 2000. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* 57:316-324.
- Oka, Y. und Y. Hirai. 1996. Inductive influences of epimorphin on endothelial cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 222:189-198.
- Okazaki, T., A. Bielawska, R.M. Bell und Y.A. Hannun. 1990. Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 265:15823-15831.
- Pagliocca, A., L.E. Wroblewski, F.J. Ashcroft, P.J. Noble, G.J. Dockray und A. Varro. 2002. Stimulation of the gastrin-cholecystokinin(B) receptor promotes branching morphogenesis in gastric AGS cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 283:G292-G299.
- Pelham, H.R. 1993. Is epimorphin involved in vesicular transport? *Cell* 73:425-426.
- Perry, I., R. Hardy, C. Tselepis und J.A. Jankowski. 1999. Cadherin adhesion in the intestinal crypt regulates morphogenesis, mitogenesis, motogenesis, and metaplasia formation. *Mol. Pathol.* 52:166-168.
- Peters, K., D. Troyer, S. Kummer, C.J. Kirkpatrick und J. Rauterberg. 2002. Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. *Microvasc. Res.* 64:334-338.
- Pillai, S., M. Mahajan und M. Carlomusto. 1999. Ceramide potentiates, but sphingomyelin inhibits, vitamin D-induced keratinocyte differentiation: comparison between keratinocytes and HL-60 cells. *Arch. Dermatol. Res.* 291:284-289.
- Pintus, G., B. Tadolini, A.M. Posadino, B. Sanna, M. Debidia, C. Carru, L. Deiana und C. Ventura. 2003. PKC/Raf/MEK/ERK signaling pathway modulates native-LDL-induced E2F-1 gene expression and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc. Res.* 59:934-944.
- Plateroti, M., D.C. Rubin, I. Duluc, R. Singh, C. Foltzer-Jourdainne, J.N. Freund und M. Kedinger. 1998. Subepithelial fibroblast cell lines from different levels of gut axis display regional characteristics. *Am. J. Physiol* 274:G945-G954.
- Purring-Koch, C. und G. McLendon. 2000. Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:11928-11931.
- Riboni, L., A. Prinetti, R. Bassi, A. Caminiti und G. Tettamanti. 1995. A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2a cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 270:26868-26875.
- Rolls, M.M., R. Albertson, H.P. Shih, C.Y. Lee und C.Q. Doe. 2003. Drosophila aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J. Cell Biol.* 163:1089-1098.
- Rozenblum, E., M. Schutte, M. Goggins, S.A. Hahn, S. Panzer, M. Zahurak, S.N. Goodman, T.A. Sohn, R.H. Hruban, C.J. Yeo und S.E. Kern. 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57:1731-1734.
- Sadekova, S., N. Lamarche-Vane, X. Li und N. Beauchemin. 2000. The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Mol. Biol. Cell* 11:65-77.
- Sakamoto, Y., Y. Kitajima, G. Edakuni, E. Sasatomi, M. Mori, K. Kitahara und K. Miyazaki. 2001. Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* 8:477-484.

-
- Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74:5463-5467.
- Sato, N., A. Maitra, N. Fukushima, N.T. van Heek, H. Matsubayashi, C.A. Iacobuzio-Donahue, C. Rosty und M. Goggins. 2003. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 63:4158-4166.
- Sato, N., H. Matsubayashi, T. Abe, N. Fukushima und M. Goggins. 2005a. Epigenetic down-regulation of CDKN1C/p57KIP2 in pancreatic ductal neoplasms identified by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res.* 11:4681-4688.
- Sato, N., K. Mizumoto, M. Nakamura, K. Nakamura, M. Kusumoto, H. Niiyama, T. Ogawa und M. Tanaka. 1999. Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 5:963-970.
- Sato, N., A.R. Parker, N. Fukushima, Y. Miyagi, C.A. Iacobuzio-Donahue, J.R. Eshleman und M. Goggins. 2005b. Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 24:850-858.
- Sato, N., A.R. Parker, N. Fukushima, Y. Miyagi, C.A. Iacobuzio-Donahue, J.R. Eshleman und M. Goggins. 2005c. Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 24:850-858.
- Satoh, M.S. und T. Lindahl. 1992. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356:356-358.
- Sawada, M., S. Nakashima, T. Kiyono, J. Yamada, S. Hara, M. Nakagawa, J. Shinoda und N. Sakai. 2002. Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Exp. Cell Res.* 273:157-168.
- Scarlatti, F., C. Bauvy, A. Ventruti, G. Sala, F. Cluzeaud, A. Vandewalle, R. Ghidoni und P. Codogno. 2004. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J. Biol. Chem.* 279:18384-18391.
- Schleger, C., N. Arens, H. Zentgraf, U. Bleyl und C. Verbeke. 2000. Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridization (CGH). *J. Pathol.* 191:27-32.
- Schuck, S. und K. Simons. 2004. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J. Cell Sci.* 117:5955-5964.
- Schwartz, G.G. und I.M. Reis. 2000. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9:139-145.
- Scott, F.I., Jr. 1991. Polymerase chain reaction (PCR) poised for multiple routine diagnostic applications. *Am. Biotechnol. Lab* 9:4, 6.
- Sefton, B.M. und T. Hunter. 1986. From c-src to v-src, or the case of the missing C terminus. *Cancer Surv.* 5:159-172.
- Seglen, P.O. und P. Bohley. 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48:158-172.
- Shimizu, S., Y. Eguchi, W. Kamiike, Y. Itoh, J. Hasegawa, K. Yamabe, Y. Otsuki, H. Matsuda und Y. Tsujimoto. 1996. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res.* 56:2161-2166.

- Shin, C.Y., Y.P. Lee, T.S. Lee, H.J. Song und U.D. Sohn. 2002. C(2)-ceramide-induced circular smooth muscle cell contraction involves PKC-epsilon and p44/p42 MAPK activation in cat oesophagus. Mitogen-activated protein kinase. *Cell Signal.* 14:925-932.
- Simian, M., Y. Hirai, M. Navre, Z. Werb, A. Lochter und M.J. Bissell. 2001. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128:3117-3131.
- Simons, K. und E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Singer, B.B., I. Scheffrahn und B. Obrink. 2000. The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res.* 60:1236-1244.
- Singh, R.P., P. Dhawan, C. Golden, G.S. Kapoor und K.D. Mehta. 1999. One-way cross-talk between p38(MAPK) and p42/44(MAPK). Inhibition of p38(MAPK) induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44(MAPK) cascade. *J. Biol. Chem.* 274:19593-19600.
- Singleton, P.A., S.M. Dudek, E.T. Chiang und J.G. Garcia. 2005. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J.* 19:1646-1656.
- Sipos, B., D. Weber, H. Ungefroren, H. Kalthoff, A. Zuhlsdorff, C. Luther, V. Torok und G. Kloppel. 2002. Vascular endothelial growth factor mediated angiogenic potential of pancreatic ductal carcinomas enhanced by hypoxia: an in vitro and in vivo study. *Int. J. Cancer* 102:592-600.
- Skubitz, K.M., K.D. Campbell, K. Ahmed und A.P. Skubitz. 1995. CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J. Immunol* 155:5382-5390.
- Skulachev, V.P. 1998. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 423:275-280.
- Spring, J., M. Kato und M. Bernfield. 1993. Epimorphin is related to a new class of neuronal and yeast vesicle targeting proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18:124-125.
- Stahl, S., S. Weitzman und J.C. Jones. 1997. The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 1):55-63.
- Strelow, A., K. Bernardo, S. Adam-Klages, T. Linke, K. Sandhoff, M. Kronke und D. Adam. 2000. Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *J. Exp. Med.* 192:601-612.
- Sunamura, M., L.P. Lefter, D.G. Duda, R. Morita, H. Inoue, T. Yokoyama, T. Yatsuoka, T. Abe, S. Egawa, T. Furukawa, S. Fukushima, M. Oshimura, A. Horii und S. Matsuno. 2004. The role of chromosome 18 abnormalities in the progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28:311-316.
- Sundberg, U. und B. Obrink. 2002. CEACAM1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115:1273-1284.
- Sunil, N., J.M. Bennett und S.Z. Haslam. 2002. Hepatocyte growth factor is required for progesterin-induced epithelial cell proliferation and alveolar-like morphogenesis in serum-free culture of normal mammary epithelial cells. *Endocrinology* 143:2953-2960.
- Tada, M., M. Omata und M. Ohto. 1991. Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 100:233-238.

-
- Takahashi, S., T. Oda, T. Hasebe, S. Sasaki, T. Kinoshita, M. Konishi, T. Ueda, C. Nakahashi, T. Ochiai und A. Ochiai. 2001. Overexpression of sialyl Lewis x antigen is associated with formation of extratumoral venous invasion and predicts postoperative development of massive hepatic metastasis in cases with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathobiology* 69:127-135.
- Takai, N., T. Ueda, Y. Kawano, M. Nishida, K. Nasu und H. Narahara. 2005. C2-ceramide exhibits antiproliferative activity and potently induces apoptosis in endometrial carcinoma. *Oncol. Rep.* 14:1287-1291.
- Takao, S., Y. Takebayashi, X. Che, H. Shinchu, S. Natsugoe, K. Miyadera, Y. Yamada, S. Akiyama und T. Aikou. 1998. Expression of thymidine phosphorylase is associated with a poor prognosis in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin. Cancer Res.* 4:1619-1624.
- Tamura, T., R.R. Friis und H. Bauer. 1984. pp60c-src is a substrate for phosphorylation when cells are stimulated to enter cycle. *FEBS Lett.* 177:151-156.
- Tang, R.F., J. Itakura, T. Aikawa, K. Matsuda, H. Fujii, M. Kore und Y. Matsumoto. 2001. Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer. *Pancreas* 22:285-292.
- Tepel, J., M.L. Kruse, C. March, A. Fiedler, M. Kapischke, T. Ketterer, B. Sipos, B. Kremer und H. Kalthoff. 2004. Terminally modified oligodeoxynucleotides directed against p53 in an orthotopic xenograft model: a novel adjuvant treatment strategy for pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas* 28:1-12.
- Testori, A., I. Listowsky und P. Sollitti. 1994. Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site. *Gene* 143:151-152.
- Trauzold, A., S. Schmiedel, B. Sipos, H. Wermann, S. Westphal, C. Roder, W. Klapper, A. Arlt, L. Lehnert, H. Ungefroren, F.J. Johannes und H. Kalthoff. 2003. PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene* 22:8939-8947.
- Uehara, H., M. Miyamoto, K. Kato, Y. Ebihara, H. Kaneko, H. Hashimoto, Y. Murakami, R. Hase, R. Takahashi, S. Mega, T. Shichinohe, Y. Kawarada, T. Itoh, S. Okushiba, S. Kondo und H. Katoh. 2004. Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 64:3533-3537.
- Ungefroren, H., W. Lenschow, W.B. Chen, F. Faendrich und H. Kalthoff. 2003. Regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta requires MKK6-p38 mitogen-activated protein Kinase signaling downstream of Smad signaling. *J. Biol. Chem.* 278:11041-11049.
- van Meer, G. und K. Simons. 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J. Cell Biochem.* 36:51-58.
- von Bernstorff, W., M. Voss, S. Freichel, A. Schmid, I. Vogel, C. Johnk, D. Henne-Bruns, B. Kremer und H. Kalthoff. 2001. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 7:925s-932s.
- Waki, M., A. Kitanaka, H. Kamano, T. Tanaka, Y. Kubota, H. Ohnishi, J. Takahara und S. Irino. 1994. Antisense src expression inhibits U937 human leukemia cell proliferation in conjunction with reduction of c-myc expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:1001-1007.
- Wang, Y.M., M.L. Seibenhener, M.L. Vandenplas und M.W. Wooten. 1999. Atypical PKC zeta is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF-kappaB/JNK kinase and cell survival. *J. Neurosci. Res.* 55:293-302.

- Warren, S.L., L.M. Handel und W.J. Nelson. 1988. Elevated expression of pp60c-src alters a selective morphogenetic property of epithelial cells in vitro without a mitogenic effect. *Mol. Cell Biol.* 8:632-646.
- Watanabe, S., M. Hirose, X.E. Wang, K. Ikejima, H. Oide, T. Kitamura, Y. Takei, A. Miyazaki und N. Sato. 1998. A novel hepatic stellate (Ito) cell-derived protein, epimorphin, plays a key role in the late stages of liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:486-490.
- Whitcomb, D.C. 2004. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 287:G315-G319.
- Willaime, S., P. Vanhoutte, J. Caboche, Y. Lemaigre-Dubreuil, J. Mariani und B. Brugg. 2001. Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 13:2037-2046.
- Wooten, L.G. und B. Ogretmen. 2005. Sp1/Sp3-dependent regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity by the bioactive sphingolipid ceramide. *J. Biol. Chem.* 280:28867-28876.
- Yamada, H., S. Tada-Oikawa, A. Uchida und S. Kawanishi. 1999. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265:130-133.
- Yamamoto, D., Y. Sonoda, M. Hasegawa, M. Funakoshi-Tago, E. Aizu-Yokota und T. Kasahara. 2003. FAK overexpression upregulates cyclin D3 and enhances cell proliferation via the PKC and PI3-kinase-Akt pathways. *Cell Signal.* 15:575-583.
- Yeaman, C., M.I. Ayala, J.R. Wright, F. Bard, C. Bossard, A. Ang, Y. Maeda, T. Seufferlein, I. Mellman, W.J. Nelson und V. Malhotra. 2004. Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* 6:106-112.
- Yoshida, A., C. Oho, A. Omori, R. Kuwahara, T. Ito und M. Takahashi. 1992. HPC-1 is associated with synaptotagmin and omega-conotoxin receptor. *J. Biol. Chem.* 267:24925-24928.
- Zhang, L., O. Ishikawa, Y. Takeuchi und Y. Miyachi. 1998. Immunohistochemical distribution of epimorphin in human and mouse tissues. *Histochem. J.* 30:903-908.
- Zhang, L., O. Ishikawa, Y. Takeuchi, Y. Yokoyama und Y. Miyachi. 1999. Influences of keratinocyte-fibroblast interaction on the expression of epimorphin by fibroblasts in vitro. *J. Dermatol. Sci.* 20:191-196.
- Zhang, W. und H.T. Liu. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12:9-18.
- Zhao, W., S. Cavallaro, P. Gusev und D.L. Alkon. 2000. Nonreceptor tyrosine protein kinase pp60c-src in spatial learning: synapse-specific changes in its gene expression, tyrosine phosphorylation, and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:8098-8103.
- Zou, H., Y. Li, X. Liu und X. Wang. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274:11549-11556.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff, Leiter der Sektion Molekulare Onkologie, danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Marie-Luise Kruse für die Durchführung der Konfokalen Mikroskopie, die kritische Durchsicht dieser Arbeit sowie die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfe.

Herrn Dr. Wolfram Klapper danke ich für die Durchführung der „TRAP“-Assays.

An Herrn Dr. Winoto-Morbach ein herzliches Dankeschön für die freundliche Einführung in die Techniken der Lipid-Extraktion und Dünnschichtchromatografie sowie für die sehr sorgfältige Auswertung der Ceramid-Daten.

Bei Herrn Dr. Yohai Hirai bedanke ich mich für die Bereitstellung der Epimorphin-Plasmide und Antikörper.

Vielen Dank an Frau Dr. Martina Voss für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich Frau Alexandra Mith und Herrn Harald Boigs für die Hilfe bei den Durchführungen von Experimenten, die ich während meiner Schwangerschaft nicht ausführen durfte.

Bei Herrn PD Dr. Hendrik Ungefroren möchte ich mich für die Bereitstellung der pp60c-src-Primer und der entsprechenden Antikörper bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Christian Röder für die Hilfe bei technischen Problemen und an Frau Dr. Ania Trauzolt für ihre Gesprächs- und Hilfsbereitschaft jeglicher Art.

Der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Knippschild aus Ulm danke ich für die Durchführung der Serienaufnahmen.

Herrn Dr. Lasse Lehnert danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur-Techniken.

Ich danke allen Mitarbeitern der Molekularen Onkologie für das angenehme Arbeitsklima und der unzähligen Hilfestellungen.

Danksagung

Meinem Mann Martin möchte ich für die Unterstützung und meinem Sohn Elias für die täglichen Aufmunterungen danken.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die uneingeschränkte Hilfe, die mir die Arbeit erst ermöglichte.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Heike Papavlassopoulos (geb. Paulsen)

Anschrift: Schwefelstr. 3
24118 Kiel

email: papavlassopoulos_heike@hotmail.com

geboren am: 30.01.1974 in Heide (Schleswig-Holstein)

Familienstand: verheiratet, ein Sohn, geb. am 07.01.2004

Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulbildung

04/2004 – 11/2005 Doktorandin an der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, Sektion: Molekulare Onkologie, UK-SH, Campus Kiel, unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kalthoff.

11/2003 – 04/2004 Mutterschutz und Erziehungsurlaub

07/2001 – 11/2003 Doktorandin an der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, Sektion: Molekulare Onkologie, UK-SH, Campus Kiel, unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kalthoff

03/2000 – 03/2001 Diplomarbeit am Institut für Hämatopathologie, UK-SH, Campus Kiel
Durchgeführt unter der Leitung von PD Dr. habil. Guido Krupp.
Thema der Arbeit: „Entwicklung von Ribozymen zum Nachweis von Mikroorganismen“

09/1995 – 03/2001 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Biochemie, Zoologie

Publikationen/Kongresse

H. Papavlassopoulos, L. Lehnert, M.L. Kruse, J. von Bötticher, B. Winterhoff, M. Voss, M. Lerch, W. Klapper, and H. Kalthoff: Hollow spheres as *in vitro* model for differentiation of ductal adenocarcinoma of the pancreas. Exocrine pancreas cancer (The European Pancreatic Cancer-Research Cooperative), 2005, 172-187.

Jahrestagung des Deutschen Pankreas-Club, 21.11.-23.11.2002, Mannheim

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vor noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Kiel, den